مقاله پژوهشی
مجله دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان
دوره ۲۵، اردیبهشت ۱۴۰۵، ۱۷۴-۱۴۷

تعیین واریانت‌های جدید در ژن‌های tRNALys و tRNAGly میتوکندریایی مرتبط با کم‌کاری مادرزادی تیروئید بر پایه شواهد مولکولی و تحلیل بیوانفورماتیکی: یک مطالعه مورد-شاهدی

محمدمهدی حیدری[۱]، سید علی مدنی منشادی[۲]، الهه جعفری نژاد بیدگلی[۳]، مهری خاتمی[۴]، مهتاب اردویی[۵]

دریافت مقاله: ۱۴۰۴/۰۷/۰۹ ارسال مقاله به نویسنده جهت اصلاح: ۱۴۰۴/۱۱/۰۷ دریافت اصلاحیه از نویسنده: ۱۴۰۵/۰۲/۱۵ پذیرش مقاله: ۱۴۰۵/۰۲/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه عوامل پاتوژنیک شناخته‌شده‌ای برای کم‌کاری مادرزادی تیروئید وجود دارد، اما نقش تغییرات در ژنوم میتوکندریایی (mtDNA) به طور کامل درک نشده است. این مطالعه با هدف شناسایی و تحلیل عملکردی واریانت‌های میتوکندریایی در دو ژن کلیدیtRNALys و tRNAGly در بیماران مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد-شاهدی، ۷۵ بیمار، با سن ۳ تا ۱۱ سال و تعداد مشابهی فرد سالم به عنوان گروه کنترل بررسی شدند. پس از استخراج DNA از خون، نواحی ژنی tRNAGly و tRNALys به روش Touchdown-PCR تکثیر و با استفاده از تکنیک SSCP برای غربالگری واریانت‌ها بررسی شدند. واریانت‌های شناسایی شده با توالی‌یابی سانگر تأیید و سپس با مجموعه‌ای از ابزارهای پیشرفته بیوانفورماتیکی از نظر تأثیر بر ساختار دوم tRNA، پایداری مولکولی و هم‌چنین پتانسیل بیماری‌زایی، مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: دو واریانت در ژن tRNAGly، یک جهش بدمعنی (p.Val254Ile) در ژن کدکننده زیرواحد ۳ سیتوکروم اکسیداز (MT-CO3) و دو واریانت هتروپلاسمی در ژن tRNALys A>G۸۳۳۵ و A>G۸۳۴۸، شناسایی شد. واریانت A>G۱۰۰۱۱ با ایجاد اختلال در پیوندهای هیدروژنی، پایداری ساختار دوم tRNAGly را کاهش می‌دهد. واریانت T>C۱۰۰۳۴ با قرارگیری در ناحیه حیاتی حلقه متغیر، می‌تواند به شناسایی نادرست کدون منجر شود. جهش p.Val254Ile در MT-CO3 توسط تمامی نرم‌افزارهای پیش‌بینی، به عنوان یک جهش بیماری‌زای قطعی ارزیابی گردید. همچنین، واریانت‌های tRNALys در ناحیه‌ای حیاتی برای اتصال به ریبوزوم قرار دارند.

نتیجه‌گیری: این مطالعه وجود طیفی از واریانت‌های میتوکندریایی را در بیماران تأیید می‌کند و نقش اختلال در عملکرد میتوکندری را احتمالاً در پاتوژنز کم‌کاری مادرزادی تیروئید تقویت می‌کند.

واژه‌های کلیدی: کم‌کاری مادرزادی تیروئید، ژنوم میتوکندریایی، بیوانفورماتیک، tRNALys، tRNAGly، MT-CO3

ارجاع: حیدری مم، مدنی منشادی سع، جعفری‌نژاد بیدگلی ا، خاتمی م، اردویی م. تعیین واریانت‌های جدید در ژن‌های tRNALys و tRNAGly میتوکندریایی مرتبط با کم‌کاری مادرزادی تیروئید: شواهد مولکولی و تحلیل بیوانفورماتیکی. سال ۱۴۰۵، دوره ۲۵، شماره ۲، صفحات: ۱۷۴-۱۴۷.

۱- (نویسنده مسئول) دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران
تلفن: ۰۳۵-۳۱۲۳۳۳۸۱، پست الکترونیکی: Heidarimm@yazd.ac.ir
۲- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۳- دانش آموخته کارشناسی ارشد ژنتیک، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۴- دانشیار ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه یزد، یزد، ایران
۵- دانشیار گروه اطفال، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

مقدمه

کم‌کاری مادرزادی تیروئید (CH:Congenital Hypothyroidism) شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در نوزادان است که به‌دلیل تولید ناکافی هورمون‌های تیروئیدی (TH) رخ می‌دهد. این هورمون‌ها برای رشد و تکامل طبیعی سیستم عصبی مرکزی، میلین‌سازی، شکل‌گیری سیناپس‌ها و تمایز سلولی، قبل و بعد از تولد ضروری‌اند؛ در نتیجه، عدم درمان به‌موقع CH می‌تواند منجر به آسیب‌های جدی و برگشت‌ناپذیر عصبی و مغزی شود (۱). تشخیص زودهنگام CH به‌دلیل علائم نامحسوس و غیراختصاصی و هم‌چنین تأثیر هورمون‌های مادری، همواره با چالش‌های جدی مواجه است (۲). این بیماری به سه نوع اصلی طبقه‌بندی می‌شود که شامل اولیه (ناشی از دیس‌ژنزی یا اختلال در بیوسنتز هورمون تیروئید است، زمانی که علت کم‌کاری تیروئید در سطح غده تیروئید باشد)، ثانویه یا مرکزی (ناشی از کمبود TSH: زمانی که علت در سطح هیپوتالاموس یا هیپوفیز باشد) و محیطی (ناشی از اختلال عملکرد هورمون در سطح بافت‌ها). شایع‌ترین علت کم‌کاری تیروئید اولیه، کمبود ید قبل و بعد از تولد است. با این حال، اگر کمبود ید در نظر گرفته نشود، کم‌کاری تیروئید اولیه می‌تواند به دلیل نقص رشد تیروئید (دیس‌ژنز) یا نقص بیوسنتز TH (دیس‌هورمونوژنز) در غده تیروئید با موقعیت و اندازه طبیعی باشد. از نظر بیوشیمیایی، کم‌کاری تیروئید اولیه با غلظت TSH سرم بالاتر از حد طبیعی همراه با غلظت تیروکسین آزاد (fT4) کم یا طبیعی مشخص می‌شود. کم‌کاری تیروئید مرکزی می‌تواند ناشی از سنتز ناقص TSH هیپوفیز یا نقص رشد هیپوتالاموس/هیپوفیز باشد که در آن کمبود TSH می‌تواند با سایر کمبودهای هورمون هیپوفیز همراه باشد. کم‌کاری تیروئید مرکزی با fT4 سرم پایین همراه با غلظت TSH کم، طبیعی یا کمی بالا مشخص می‌شود. همچنین، از نظر بالینی نیز CH می‌تواند به دو فرم دائمی (نیازمند درمان مادام‌العمر) و گذرا (با بازگشت تولید طبیعی هورمون پس از تولد) تظاهر یابد. در برخی موارد، کم‌کاری تیروئید با ناهنجاری‌های اندامی دیگر همراه بوده و تحت عنوان «سندرمی» طبقه‌بندی می‌شود (۶-۳).

مطالعات اخیر نیز نقش بالقوه جهش‌های DNA میتوکندریایی (mtDNA) را در بروز CH مطرح کرده‌اند (۷). با تمرکز بر تأثیر هورمون‌های تیروئیدی بر سیستم عصبی، شواهد نشان می‌دهد که میتوکندری می‌تواند واسطه برخی از اثرات گزارش شده باشد. تعاملات هورمون‌های تیروئیدی با میتوکندری، معمولاً در زمینه تنظیم متابولیسم در حالت هموستاتیک یک فرد بالغ مورد مطالعه قرار می‌گیرد. با این حال، همان‌طور که مفهوم نقش میتوکندری به‌عنوان عامل اصلی در هموستازی با تأمین ATP مشخص شده است، درک تعاملات هورمون‌های تیروئیدی با میتوکندری نیز در یک الگوی نوظهور دچار تغییرات آشکاری گردیده است. مدل‌های ژنتیکی جدید، نقش میتوکندری را در هماهنگ‌سازی رشد سلول‌ها در دوره قبل از تولد برجسته می‌کنند. این مطالعات در راستای تحقیقاتی است که نشان می‌دهد پویایی میتوکندری و تمایزات عصبی، ارتباط نزدیکی با هم دارند. بررسی مکانیسم‌های زمینه‌ساز تمایزات عصبی توسط میتوکندری نشان می‌دهد که محصولات جانبی متابولیک میتوکندری (مانند گونه‌های فعال اکسیژن) روند تمایزات عصبی را در جنین به پیش می‌برند. با توجه به نقش ثابت‌شده سیگنال‌های میتوکندریایی در تولید و تقویت هورمون‌های تیروئیدی، هدف محققان اخیر نیز این است که آیا تغییرات نوکلئوتیدی ژنوم میتوکندری بر میزان تولید و اثر هورمون‌های تیروئیدی در رشد و تمایزات عصبی تأثیر دارند یا خیر (۸).

میتوکندری به‌عنوان مرکز تولید انرژی سلولی، دارای ژنوم مستقل و سیستم ترجمه‌ای اختصاصی است. این اندامک علاوه بر

CCBY-NC.4.0 DEED

سنتز ATP از طریق فسفوریلاسیون اکسیداتیو، در متابولیسم اسیدهای آمینه، تولید فسفولیپیدها، تنظیم سیگنالینگ کلسیم و القای آپوپتوز نقش مهمی ایفاء می‌کند. هم‌چنین میتوکندری‌ها در سیگنال‌دهی کلسیم، پاسخ به استرس، مرگ برنامه‌ریزی‌شده سلولی و پیری نقش دارند و اختلال عملکرد آن‌ها می‌تواند موجب بروز بیماری‌های ارثی و مادرزادی شود. ژنوم میتوکندریایی شامل ۳۷ ژن است که ۱۳ ژن کدکننده زیرواحدهای کمپلکس‌های I، III، IV و V زنجیره تنفسی، دو ژن کدکننده rRNA و ۲۲ ژن نیز tRNA را کد می‌کنند. سایر اجزای این کمپلکس‌ها توسط ژنوم هسته‌ای کد می‌شوند (۹). برخلاف هسته سلول، mtDNA فاقد هیستون و مکانیسم‌های ترمیمی مؤثر است و در معرض آسیب‌های اکسیداتیو بیش‌تری قرار دارد. هر سلول انسانی، حاوی صدها میتوکندری و هزاران نسخه از mtDNA است؛ که این ویژگی موجب ایجاد پدیده‌ای به‌نام هتروپلاسمی می‌شود؛ یعنی همزیستی نسخه‌های سالم و جهش‌یافته mtDNA در یک سلول. یکی از پیامدهای مهم هتروپلاسمی، پیچیدگی در پیش‌بینی الگوی توارث و شدت بروز بیماری در نسل‌های بعدی است. بر اساس «فرضیه گردن بطری»، توارث مادری mtDNA همراه با تغییرات تصادفی در نسبت آلل‌های جهش‌یافته، می‌تواند منجر به طیف وسیعی از تظاهرات بالینی در فرزندان گردد (۱۰). اگرچه ژن‌های tRNA تنها ۱۰ درصد از ژنوم میتوکندری را تشکیل می‌دهند، اما بیش از ۵۰ درصد جهش‌های بیماری‌زا در این ناحیه گزارش شده‌اند. این جهش‌ها می‌توانند باعث اختلال در ساختار و تاخوردگی tRNA، کاهش کارآیی فرایند ترجمه، نقص در تولید پروتئین‌های کمپلکس تنفسی و کاهش تولید ATP شوند (۱۱). سلول‌های تیروئید برای سنتز هورمون‌های تیروئیدی (T3 و T4) به انرژی زیادی نیاز دارند، بنابراین اختلال در عملکرد میتوکندری می‌تواند بر عملکرد تیروئید تأثیر بگذارد. از سوی دیگر، جهش‌های بدمعنی در ژن‌های کد کننده کمپلکس‌های OXPHOS، جهش‌های نقطه‌ای در rRNA و بازآرایی‌های ژنومی (مانند حذف یا تکرار بخشی از mtDNA) نیز از دیگر انواع شناخته‌شده جهش‌های بیماری‌زای میتوکندریایی هستند. هرگونه اختلال در عملکرد میتوکندری می‌تواند منجر به افزایش تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) و آسیب به DNA میتوکندری شود. این وضعیت ممکن است باعث مرگ سلول‌های تیروئید (آپوپتوز) و نهایتاً کاهش عملکرد غده تیروئید گردد (۱۲). برخی مطالعات نیز جهش‌هایی مانند (m.3243A>G) در ژن tRNA Leu(UUR) را با اختلالات متابولیک و اندوکرینی از جمله دیابت و کم‌کاری تیروئید مرتبط دانسته‌اند (۱۳). اگرچه کم‌کاری مادرزادی تیروئید، غالباً ناشی از جهش‌های ژن‌های هسته‌ای (مانند PAX8, TSHR, TG, TPO) است، اما جهش‌های mtDNA به‌ویژه در ژن‌های tRNA میتوکندری، نیز می‌توانند در مواردی با اختلال عملکرد تیروئید همراه باشند. این جهش‌ها عمدتاً از طریق اختلال در تولید انرژی و افزایش استرس اکسیداتیو بر سلول‌های تیروئید تأثیر می‌گذارند (۱۴). در مطالعه حاضر، که برای اولین‌بار در بیماران ایرانی انجام می‌شود، به منظور بررسی نقش جهش‌های ژنوم میتوکندری در ۷۵ بیمار مبتلا به کم‌کاری تیروئید مادرزادی (CH)، غربال‌گری جهش در دو ژن نقطه داغ tRNA گلایسین و لیزین، و هم‌چنین ژن MT-CO3 انجام شد. انتخاب بیماران براساس معیارهای بالینی و فنوتیپی دقیق صورت گرفت. با این حال، توصیف دقیق کم‌کاری تیروئید بسیار دشوار است، زیرا عملکرد تیروئید در دوران کودکی، تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله سن، جنس، توده بدن، رژیم غذایی یددار، قد و بلوغ قرار دارد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه، ۷۵ بیمار غیرخویشاوند (۵۴ زن و ۲۱ مرد) در محدوده سنی ۳ تا ۱۱ سال (میانگین± انحراف معیار: ۵/۶۸±۲/۷)

CCBY-NC.4.0 DEED

که توسط متخصص غدد کودکان به‌عنوان مبتلا به کم‌کاری تیروئید اولیه (CH) تشخیص داده شده بودند، از کلینیک متابولیسم و غدد و بخش کودکان بیمارستان شهید صدوقی یزد، انتخاب شدند. تشخیص بر اساس سطح بالای TSH (بیش از ۱۰ mU/L) و سطح پایین T4 آزاد (کمتر از ۹ pmol/L) صورت گرفت (جدول ۱). سونوگرافی تیروئید، برای بررسی آژنزی (عدم تشکیل تیروئید)، هیپوپلازی (تیروئید کوچک)، یا اکتوپی (تیروئید نابجا) انجام شد. هیپوپلازی تیروئید با اندازه‌گیری حجم کل تیروئید و بررسی ارتباط آن با قد، جنسیت، سن و سطح بدن ارزیابی شد. اندازه‌گیری تیروگلوبولین (Tg) نیز برای افتراق بین دیسژنزی تیروئید و اختلالات سنتز هورمون‌های تیروئیدی انجام شد. سوابق پزشکی نشان داد که ۱۵ بیمار سابقه خانوادگی مثبت اختلالات تیروئیدی داشتند. به‌عنوان مثال، یک دختر ۴/۵ ساله با هیپوتیروئیدیسم زودرس، دارای دو برادر ۳/۵ و ۶ ساله بود که برادر بزرگ‌تر به CH مبتلا بود. همچنین، یک دختر دیگر دارای سه برادر و ۸ دختر نیز دارای اختلالات تیروئیدی و کم‌کاری تیروئید در بستگان نزدیک والدین خود بودند. این مطالعه با تأیید کمیته اخلاق دانشگاه یزد انجام شد (IR.YAZD.REC.1402.050) و رضایت‌نامه آگاهانه از والدین تمامی بیماران اخذ شد.

جدول ۱- الگوهای بالینی در بیماران مبتلا به کم کاری تیروئید مادرزادی (CH) و گروه کنترل

سوابق پزشکی	افراد بیمار: ۷۵ نفر	افراد کنترل: ۶۹ نفر
سن در زمان نمونه‌گیری	**بیماران: ۳–۱۱ سال (میانگین ± انحراف معیار: ۵/۶۸)**	**کنترل‌ها: ۳/۵–۱۲/۵ سال (میانگین ± انحراف معیار: ۶/۹۱)**
نسبت زن / مرد:	۵۴/۲۱	۴۹/۲۰
وزن هنگام تولد (گرم):	۲۱۰۰-۳۸۰۰	۳۰۰۰-۴۱۰۰
تیروگلوبولین (TG) (mg/L):	۰/۰۵-۹/۶۶	۳/۵-۵۶
هورمون محرک تیروئید (TSH) (mU/L):	۹/۶۱-۴۸	۰/۷-۵/۶
T4 آزاد (fT4) (pmol/L):	۰/۷-۶/۵	۰/۹-۱۹

TSH: هورمون محرک تیروئید/ fT4: تترا-یدوتیرونین آزاد/ TG: تیروگلوبولین

آنالیزهای مولکولی و شناسایی واریانت‌های ژن‌های میتوکندریایی *tRNA* گلایسین و *tRNA* لیزین از طریق DNA استخراج شده از خون محیطی بیماران انجام شد. برای استخراج DNA، از روش استاندارد شست‌وشوی نمکی (Salting-out) استفاده گردید. سپس میزان DNA استخراج‌شده با استفاده از اسپکتروفتومتر NanoDrop 2000 اندازه‌گیری و ارزیابی شد.

جهت شناسایی جهش‌های نقطه‌ای و تغییرات نوکلئوتیدی در ژن‌های میتوکندریایی *tRNA* گلایسین و *tRNA* لیزین، از قطعات تکثیر شده با روش Touchdown -PCR استفاده شد. برای این منظور، دو جفت پرایمر فوروارد و ریورس، اختصاصی ناحیه‌های ژن‌های میتوکندریایی با استفاده از نرم‌افزار آنلاین Primer3 طراحی گردید. مشخصات پرایمرهای طراحی شده در جدول ۲ ذکر شده است.

CCBY-NC.4.0 DEED

جدول ۲- توالی و موقعیت پرایمرها برای تکثیر نواحی ژنی در ژنوم میتوکندری

محصول PCR	توالی پرایمر	موقعیت نوکلئوتیدی	ناحیه ژنی	نام پرایمر
۲۵۰ bp	5'-ATT AAT TCC CCT AAA AAT CT-3' 5'-TAG GTG GTA GTT TGT GTT TA-3'	۸۲۲۱-۸۲۴۰ ۸۴۷۰-۸۴۵۱	$tRNA^{GLY}$	ONP 151 (F) ONP 59 (R)
۳۰۰bp	5'-CAC TAT CTG CTT CAT CCG CC-3' 5'-ATG TAG CCG TTG AGT TGT GG-3'	۹۸۵۱-۹۸۷۰ ۱۰۱۵۰-۱۰۱۳۱	$tRNA^{LYS}$	ONP 91 (F) ONP 92 (R)

مراحل Touchdown -PCR در شرایط استریل و زیر هود، بر روی یخ انجام شد. واکنش‌های Touchdown -PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر، شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA نمونه، ۱۰ پیکومول از هر پرایمر فوروارد و ریورس، ۱/۸ میلی‌مولار MgCl2، ۱۰۰ میلی‌مولار از هر dNTP، ۵/۲ میکرولیتر ۱۰x PCR buffer و ۰/۵ واحد Taq polymerase بودند. برای جلوگیری از آلودگی، از کنترل منفی استفاده شد؛ به این صورت که تمام مواد لازم برای PCR به‌جز DNA الگو به میکروتیوب کنترل منفی اضافه گردید. سپس نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر Techne Prime قرار گرفتند و تکثیر DNA انجام شد. در ادامه، فرآیند PCR طبق برنامه دمایی زیر اجرا شد: ابتدا، یک مرحله واسرشتگی اولیه به مدت ۳ دقیقه در ۹۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد. سپس، پنج سیکل شامل واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، اتصال پرایمرها در دمای ۶۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، کاهش ۱ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) انجام شد. پس از آن، ۳۰ سیکل با واسرشتگی در ۹۵ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه)، اتصال در ۵۸ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) و گسترش در ۷۲ درجه سانتی‌گراد (۳۰ ثانیه) انجام شد. در نهایت، یک مرحله گسترش نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام گردید. پس از اتمام واکنش Touchdown -PCR، جهت بررسی نتایج آزمایش، محصولات PCR برای انجام الکتروفورز آماده شدند. از ژل آگارز ۱/۵ درصد برای جداسازی محصولات PCR استفاده شد و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، نتایج با استفاده از سیستم‌های مستندسازی ژل مشاهده و تأیید شدند.

محصولات تکثیر شده PCR از تمامی بیماران مبتلا به CH و گروه کنترل و سالم، با استفاده از تکنیک SSCP غربال‌گری شدند. این روش براساس تفاوت‌های ساختار سه‌بعدی توالی‌های تک‌رشته‌ای DNA عمل می‌کند. در این تکنیک، ابتدا DNA دورشته‌ای با استفاده از حرارت به حالت تک‌رشته‌ای تبدیل می‌شود و سپس به‌سرعت سرد می‌شود تا DNA تک‌رشته‌ای شکل‌گیرد. در روش SSCP، از ژل پلی‌آکریل‌آمید استفاده می‌شود که دارای منافذ ریزتری نسبت به ژل آگارز است و این امکان را می‌دهد که تغییرات ژنی، حتی در سطح یک نوکلئوتید، شناسایی شوند. برای انجام تکنیک SSCP، 10 میکرولیتر از محصولات PCR ابتدا با ۷ میکرولیتر محلول بارگیری SSCP (حاوی ۹۵ درصد فرمامید، ۱۰ میلی‌مولار NaOH، ۴۵ درصد ساکارز، و ۰/۲ درصد زایلن سیانول) مخلوط شدند. سپس، قطعات DNA به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد واسرشته و بلافاصله به مدت ۵ دقیقه در حمام یخ خنک شدند. قطعات DNA روی ژل پلی‌اکریل‌آمید ۷ درصد (با نسبت ۴۹:۱ آکریل‌آمید به بیس‌آکریل‌آمید) بارگذاری شده و به مدت ۱۶-۱۸ ساعت در ولتاژ ۱۱۰ ولت در دمای اتاق جداسازی شدند. باندهای SSCP بر روی ژل با استفاده از روش رنگ‌آمیزی نقره مشاهده شدند. پس از اجرای تکنیک SSCP، قطعاتی که الگوی مهاجرتی متفاوتی نسبت به نمونه‌های کنترل سالم در ژل نشان می‌دادند، مستقیماً برای

CCBY-NC.4.0 DEED

شناسایی تغییرات نوکلئوتیدی توالی‌یابی شدند. نتایج تعیین توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزار MEGA5 و برنامه Chromas تحلیل شده و تغییرات نوکلئوتیدی با پایگاه داده جهش‌های ژن مورد نظر مقایسه گردید. در نهایت، وجود جهش‌های نوکلئوتیدی در افراد بیمار تأیید شد.

توالی ژن‌های مورد نظر با استفاده از پایگاه اینترنتی NCBI بررسی‌شد. سپس، طراحی و آنالیز پرایمرها با کمک نرم‌افزار Gene Runner انجام گرفت. به‌منظور مقایسه توالی ژن‌های مورد نظر، با توالی‌های سایر گونه‌ها و بررسی میزان حفاظت شدگی ژنومی و پیش‌بینی اثرات تکاملی، از نرم‌افزارهای Gene Runner و MEGA4 و ابزراهای بیوانفورماتیکی نظیر PhyloP و برای شناسایی نواحی محدود شده تکاملی (RS scores) از GERP++ استفاده شد. به‌منظور شناسایی ساختار دوم tRNA و مقایسه tRNA انسان با سایر پستانداران و هم‌چنین برای بررسی میزان حفاظت نوکلئوتیدها، جهش‌های پاتوژن و پلی‌مورفیسم‌های گزارش‌شده در بخش‌های مختلف tRNA میتوکندریایی، از سایت MAMIT-tRNA بهره‌برداری شد. هم‌چنین از بانک اطلاعاتی ژنوم میتوکندری انسان و بررسی جهش‌های mtRNA از MITOMAP استفاده‌شد. علاوه‌براین، به منظور پیش‌بینی اثرات ساختاری و عملکردی و اثر جهش‌های mt-tRNA بر ساختار و عملکرد tRNA از ابزار آنلاین MitoTIP، برای شناسایی ژن‌های tRNA و پیش‌بینی ساختار ثانویه، از پایگاه داده tRNAscan-SE، به منظور مقایسه ساختار ثانویه در پروتئین‌های نرمال و جهش‌یافته، از سایت Psipred، برای پیش‌بینی ساختار ثانویه tRNA و بررسی تأثیر تغییرات نوکلئوتیدی بر ساختار آن، از RNAfold و برای پیش‌بینی بیماری‌زایی واریاته‌های ژنوم میتوکندری از پایگاه داده HmtVar استفاده شد. علاوه‌براین، جهت پیش‌بینی تأثیر احتمالی جهش‌های ژنی بر ساختار و عملکرد پروتئین، سایت SIFT و جهت پیش‌بینی تأثیر تغییر اسید آمینه بر ساختار و عملکرد پروتئین، پایگاه اینترنتی PolyPhen2 استفاده شد. تحلیل تغییرات هیدروفوبیسیته در پروتئین جهش یافته نیز با استفاده از سایت ExPASy انجام گرفت. همچنین، به منظور پیش‌بینی اثرات تاشدگی (فولدینگ) پروتئین و پیش‌بینی تغییرات پایداری پروتئین ناشی از جهش‌های نوکلئوتیدی، از سرور آنلاین I-Mutant و جهت تحلیل سه‌بعدی تأثیر جهش‌های ژنتیکی بر ساختار پروتئین، از پایگاه پیش‌بینی HOPE استفاده شد. در ادامه، برای مشاهده ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها و اعمال جهش‌ها روی پروتئین، از نرم‌افزار PyMOL و پایگاه اینترنتی QUARK استفاده گردید.

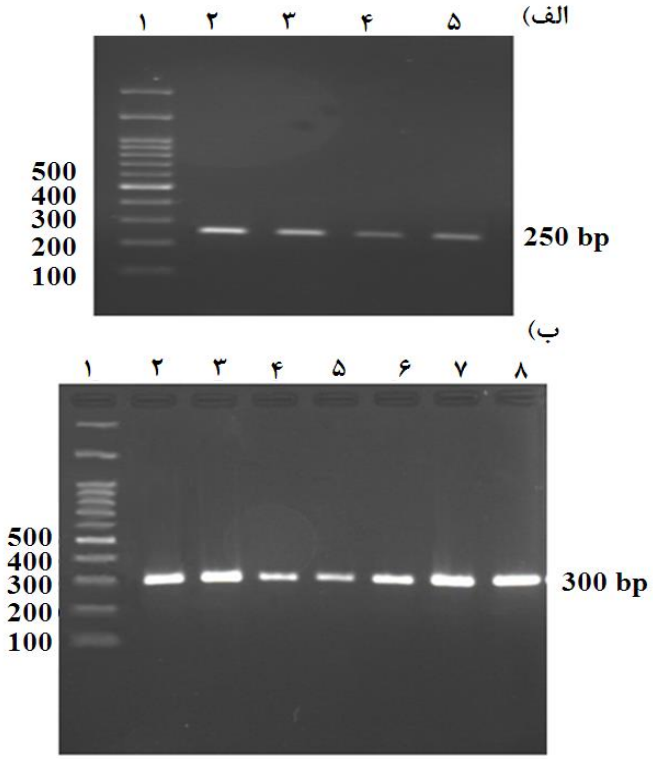
نتایج

پس از استخراج DNA از نمونه‌های خون بیماران و افراد کنترل، برای بررسی کیفیت استخراج و صحت تکثیر قطعات ژنی هدف از روش PCR-Touchdown و الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ درصد استفاده‌گردید. شکل ۱ الف، نشان دهنده نتایج الکتروفورز محصولات PCR مربوط‌به قطعه ۲۵۰ جفت‌بازی tRNA گلایسین برروی ژل آگارز است و هم‌چنین نتایج الکتروفورز محصولات PCR قطعه ۳۰۰ جفت‌بازی tRNA لیزین روی ژل آگارز در شکل ۱ ب، قابل مشاهده است. پس از انجام PCR و مشاهده باندهای شارپ که نشان دهنده موفقیت‌آمیز بودن واکنش تکثیر قطعات ژنی هدف است، از روش SSCP برای شناسایی جهش‌های احتمالی در قطعات مورد نظر استفاده شد. نمونه‌هایی که تغییراتی در الگوی باندینگ روی ژل داشتند، برای بررسی دقیق‌تر برای تعیین توالی مستقیم، بصورت دوطرفه به شرکت زیست فناوری پیشگام (تهران) ارسال شدند.

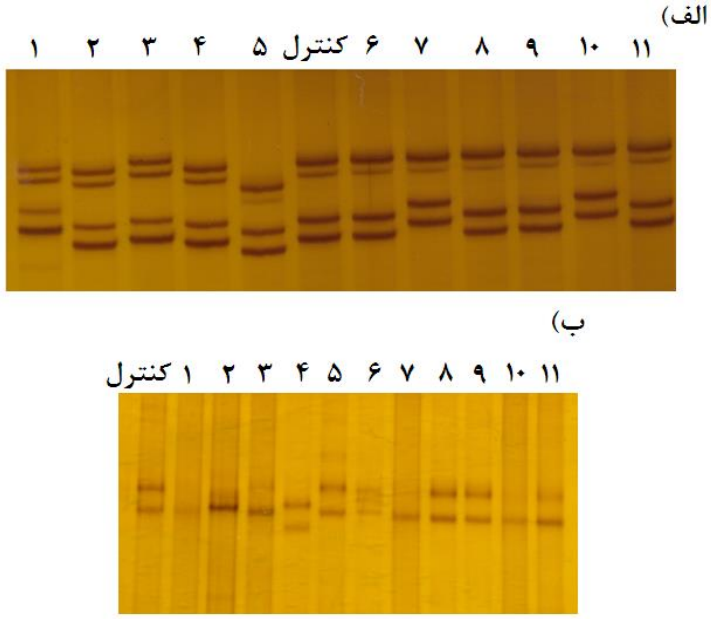
CCBY-NC.4.0 DEED

بررسی ژن tRNA گلایسین میتوکندری و ژن کدکننده MT-CO3

توالی دو ژن tRNA گلایسین میتوکندری و MT-CO3، از نوکلئوتید ۹۹۹۱ در ژنوم میتوکندری آغاز شده و تا نوکلئوتید ۱۰۰۵۸ ادامه‌دارد. توالی ژن tRNA لیزین میتوکندری نیز از نوکلئوتید شماره ۸۲۹۵ آغاز شده و تا نوکلئوتید شماره ۸۳۶۴ ادامه می‌یابد. تصاویر ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید در روش SSCP، مربوط به قطعه ژن‌های tRNA گلایسین و MT-CO3 (شکل ۲ الف) و قطعه ژن tRNA لیزین (شکل ۲ ب) نشان می‌دهند که نمونه‌هایی از بیماران، الگوی باندینگ متفاوتی نسبت به سایر نمونه‌ها و گروه کنترل را داشتند. پس از تأیید تکرارپذیری این نتایج، نمونه‌های موردنظر برای تعیین توالی، به شرکت پیشگام ارسال شد.



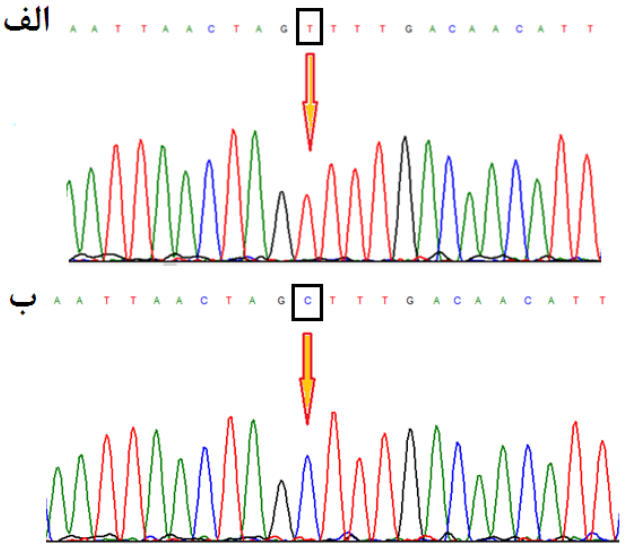
شکل ۱- باندهای شارپ و بدون اسمیر حاصل از الکتروفورز محصولات PCR الف) قطعه ۲۵۰bp حاوی ژن tRNA گلایسین و MT-CO3 و ب) قطعه ۳۰۰bp حاوی ژن tRNA لیزین میتوکندری.



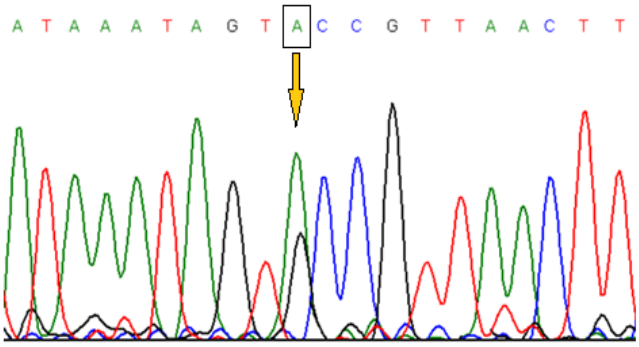
شکل ۲- تصاویر SSCP روی ژل‌های پلی‌اکریل‌آمید، مربوط به قطعه ژن‌های tRNA گلایسین و MT-CO3 (۴ الف) و قطعه ژن tRNA لیزین (۴ ب). نمونه‌هایی که دارای الگوی باندینگ متفاوتی با دیگر نمونه‌ها و افراد کنترل، برای تعیین توالی غربال‌گری شدند.

CCBY-NC.4.0 DEED

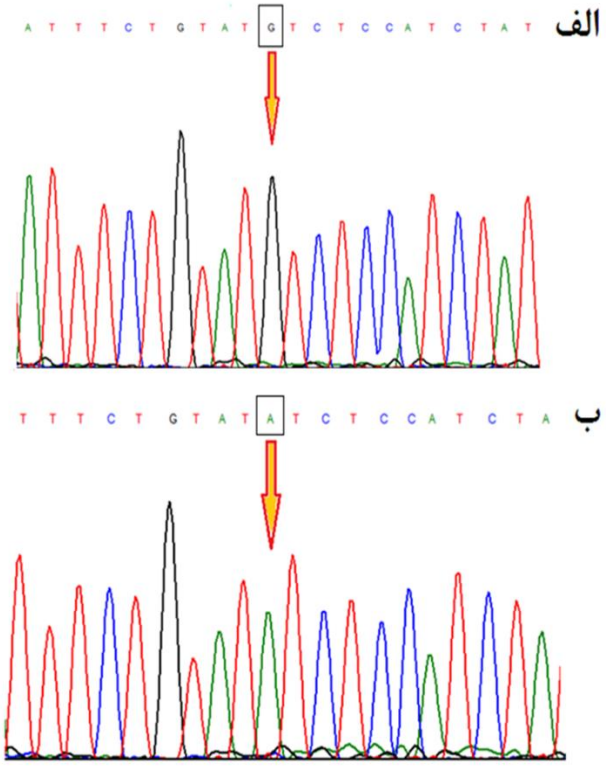
نتایج تعیین توالی، وجود پنج جهش میتوکندریایی را آشکار ساخت، یک پلی‌مورفیسم هموپلاسمی در موقعیت ۱۰۰۳۴ (T>C) در ژن tRNA مربوط به اسید آمینه گلایسین، یک جهش جدید هتروپلاسمی در موقعیت ۱۰۰۱۱ (A>G) در همان ژن tRNA گلایسین و یک جهش هموپلاسمی در موقعیت ۹۹۶۶ (G>A) در ژن MT-CO3 که منجر به جایگزینی اسید آمینه والین با ایزولوسین در موقعیت ۲۵۴ پروتئین کد شده می‌گردد. همچنین، توالی‌یابی، دو واریانت هتروپلاسمی در ژن کدکننده MT- tRNALys را شناسایی کرد: یک واریانت جدید (A>G۸۳۳۵) و یک واریانت شناخته شده (A>G۸۳۴۸). الکتروگرام‌های این جایگزینی‌های نوکلئوتیدی در بیماران مبتلا به کم‌کاری تیروئید اولیه در شکل‌های ۳ تا ۶ نشان داده شده است.



شکل ۳- نتیجه تعیین توالی الف) فرد کنترل و ب) جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی هموپلاسمی T>C 10034 در ژن tRNA گلایسین میتوکندری در دختری ۳ ساله مبتلا به کم‌کاری تیروئید اولیه

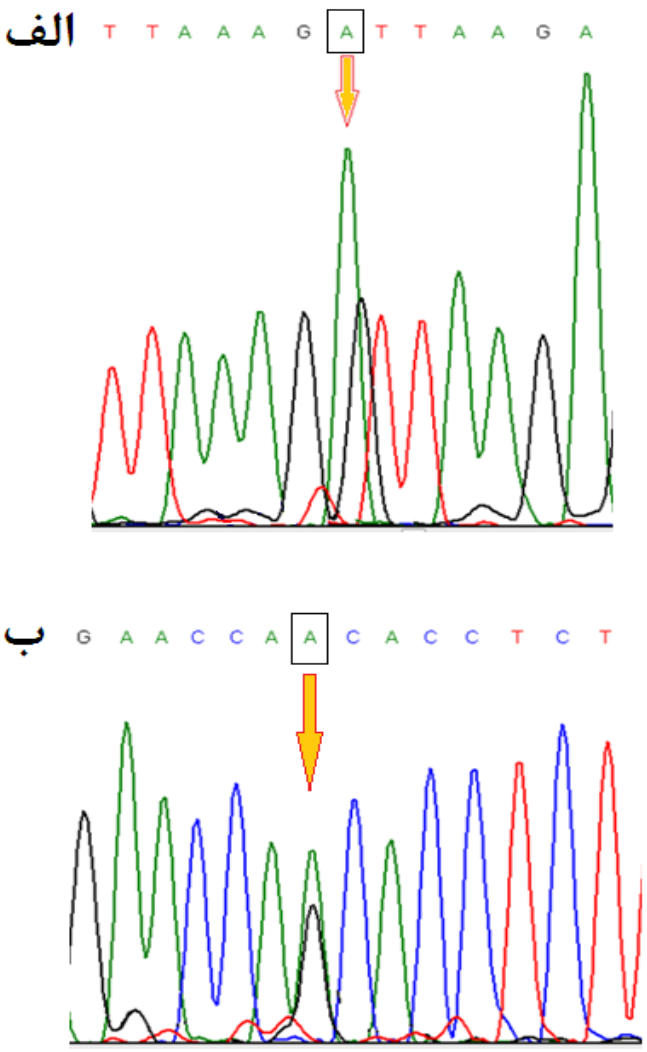


شکل ۴- تصویر کروماتوگرام جایگزینی تک نوکلئوتیدی هتروپلاسمی 10011A>G در ژن tRNA گلایسین میتوکندری حاصل از تعیین توالی دختری ۴ ساله و مبتلا به کم‌کاری تیروئید اولیه است.



شکل ۵- نتیجه‌ی تعیین توالی الف) فرد کنترل و ب) جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی هموپلاسمی G> A 9966 در ژن MT-CO3 میتوکندری، در دختر بیمار ۴ ساله و مبتلا به کم‌کاری تیروئید اولیه.

CCBY-NC.4.0 DEED

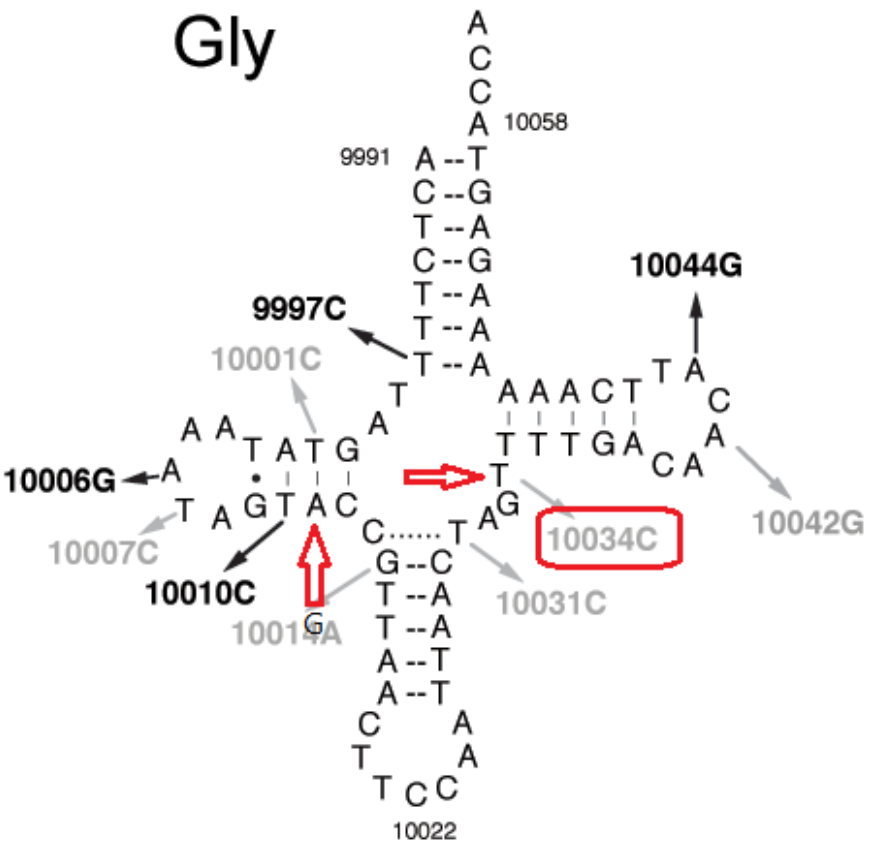


شکل ۶- تصویر کروماتوگرام جایگزینی تک نوکلئوتیدی الف) هتروپلاسمی جدید 8335 A > G و ب) 8348 A> G در tRNA لیزین میتوکندری در الف) پسر بیمار سه ساله و ب) دختر بیمار دو ساله و مبتلا به کم‌کاری تیروئید اولیه.

نتایج تحلیل‌های بیوانفورماتیکی برای پیش‌بینی اثر بیماری‌زایی جهش‌ها

نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی در پایگاه‌های داده جهش‌های میتوکندریایی مانند MITOMAP ، برای جهش ۱۰۰۳۴ T>C در ژن MT-tRNA گلایسین میتوکندریایی نشان داد که این جهش قبلا گزارش شده است و ارتباط آن با بیماری‌های میتوکندریایی (مانند MELAS, MERRF و بیماری‌های عصبی-عضلانی) اثبات شده است. همچنین با بررسی پایگاه ClinVar/NCBI و HmtVar مشخص گردید که این جهش به‌عنوان پاتوژن/ احتمالاً پاتوژن طبقه‌بندی شده است و پیش‌بینی بیماری‌زایی آن بر اساس الگوریتم‌های یادگیری ماشین تأیید گردیده است. برای پیش‌بینی اثرات ساختاری این جهش بر tRNA گلایسین، تحلیل ساختار دوم tRNA با RNAfold (ViennaRNA) انجام شد تا مشخص گردد آیا جهش ۱۰۰۳۴ T>C باعث تغییر در ساختار ساقه-لوپ tRNA می‌شود یا خیر. نتایج موید تأثیر احتمالی این جهش بر محل حلقه متغیر (بین ساقه TΨC و پذیرنده) بود (شکل ۷). هم‌چنین، این نرم‌افزار تغییر ناچیزی در پایداری را طی این جهش، پیش‌بینی کرد ($\Delta\Delta G = +0.4$ kcal/mol). در مقایسه با جهش‌های شناخته شده بیماری‌زا در MT-tRNA گلایسین، مشخص گردید که نزدیک‌ترین جهش پاتوژن m.10044A>G در MT-tRNA گلایسین است که با نوروپاتی بینایی مرتبط است. برای بررسی حفاظت شدگی تکاملی (Evolutionary Conservation) نتایج PhyloP/ GERP++نشان داد که موقعیت ۱۰۰۳۴ در ژنوم میتوکندری در پستانداران نسبتا حفاظت شده است، بگونه‌ای که امتیاز RS (GERP++) > 2 نشان دهنده فشار تکاملی برای حفظ این نوکلئوتید است (شکل ۸). پیش‌بینی بیماری‌زایی با ابزارهای تخصصی MitoTIP نیز امتیاز بیماری‌زایی برای جهش ۱۰۰۳۴ T>C را ≤۱۵ پیش‌بینی کرد که احتمال بیماری‌زایی بالایی را تأیید می کند، هم‌چنین این پایگاه داده نشان داد که درصورتی که این جهش بیماری‌زا باشد، ممکن است با علائمی همچون ضعف عضلانی، نوروپاتی، اختلالات بینایی (به دلیل نقص در تولید ATP) ، اسیدوز لاکتیک (اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو) و بیماری‌های میتوکندریایی با درگیری چندسیستمی مرتبط باشد. بقیه پایگاه‌های داده میتوکندری پیش بینی کردند که ممکن است این جهش یک واریانت با اهمیت نامشخص (VUS) باشد که نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۷- ساختار دوم tRNA گلایسین میتوکندریایی و جهش‌های گزارش‌شده برگرفته از سایت MAMIT-tRNA. شماره‌های تیره جهش‌های پاتوژن شناخته شده و شماره‌های روشن، جهش‌های پلی‌مورفیسم گزارش‌شده است، پیکان‌های قرمز تغییرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در بیماران مورد مطالعه است. تغییر T10034C به‌عنوان پلی‌مورفیسم قبلا گزارش شده است ولی جهش A10011G جدید است و تاکنون گزارش نشده است.

در بررسی و تحلیل جهش ۱۰۰۱۱ A>G در ژن MT-tRNA گلایسین میتوکندریایی در MITOMAP و gnomAD مشخص گردید که این جهش در لیست جهش های شناخته شده میتوکندریایی گزارش نشده است و نزدیک‌ترین جهش‌های گزارش شده در این ناحیه A>G۱۰۰۰۶ و A>G۱۰۰۴۴ هستند. ClinVar نیز تأیید کرد که تاکنون گزارشی از این جهش در ثبت نشده است ولی جهش‌های مشابه در این ژن، عمدتاً با بیماری‌های میوپاتی و نوروپاتی مرتبط هستند. HmtVar برای پیش‌بینی اثر بیماری‌زایی جهش،گروهبندی احتمالاً خنثی (نیاز به تحلیل بیشتر) را و نمره بیماری‌زایی ۱۲ (حد آستانه معمولاً ۱۵+ برای بیماری‌زا در نظر گرفته می‌شود) را برای این جهش تعیین کرد. در بررسی و تحلیل ساختاری و عملکردی این جهش مشخص شد که موقعیت ۱۰۰۱۱ در ساختار tRNAدر ناحیه حلقه D (DHU) قرار دارد و این ناحیه غیر بحرانی در شناسایی آنزیم‌های تعدیل‌کننده tRNA نقش دارد. از نظر تغییر در ساختار tRNA گلایسین، این جهش منجر به گسست جفت باز A11-U25 → G11-U25 می‌گردد (شکل ۹).

CCBY-NC.4.0 DEED

Organism	Acc-stem		D-stem	D-loop	D-stem		Ac-stem	Anticd-loop	Ac-stem	V-region	T-stem	T-loop	T-stem	Acc-stem	
	1	8	10		22	26	27	32	39	44	49		61	66	73
Cebus albifrons	ATTCTCT	TA	GTAT	AAACA	GTAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TTAAT	AGGC	CTTGA	TAAAC	CCAAG	AGAGAAT	A
Colobus guereza	ATTCTTT	TA	GTAT	AGCCA	GTAC	A	GCTGA	CTTCCAA	TCAAC	TAGC	TCCGA	TCAACAC	TCGGA	AAAGAAT	A
Gorilla gorilla	ACTCTTT	TA	GTAT	AATTA	GTAC	C	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	CAGT	TTTGG	TAGTAC	CCAAA	AAAGAGT	A
Homo sapiens	ACTCTTT	TA	GTAT	AAATA	GTAC	C	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	TAGT	TTTGA	CAACAT	TCAAA	AAAGAGT	A
Hylobates lar	ACTCTTT	TA	GTAT	AAACA	GTAC	T	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	CAGC	TTCGA	TAACGC	TCGAA	AAAGAGT	A
Lemur catta	ATTCTTT	TA	GTAT	CGACCCA	ATAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TTAAT	TAAC	TTCGG	TGAAAA	CCGGA	AAAGAAT	A
Macaca mulatta	ACTCTTT	TA	GTAT	AACAA	GTAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TCAAT	CAGT	TTTGA	CAACAT	TCAAA	AAAGAGT	A
Macaca sylvanus	ACTCTTT	TA	GTAT	AACCA	GTAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TCAAT	CAGT	TTTGA	CAACAT	TCAAA	AAAGAGT	A
Nycticebus coucang	GCTCTTT	TA	GTAC	AACTA	GTAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TCAAT	AGGA	TTTGG	TAAATAA	CCAAA	AGAGAGC	A
Pan paniscus	ACTCTTT	TA	GTAT	AAGCA	GTAC	C	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	TAGT	TTTGA	CAACAT	TCAAA	AAAGAGT	A
Pan troglodytes	ACTCTTT	TA	GTAT	AAGTA	GTAC	C	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	TAGT	TTTGA	CAACAT	TCAAA	AAAGAGT	A
Papio hamadryas	ACTCTTT	TA	GTAT	AATTA	GTAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TCAAT	CAGC	TTTGA	CAATAT	TCAAA	AAAGAGT	A
Pongo pygmaeus	ACTCTTT	TA	GTAT	AAGCA	GTAC	C	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	CAGT	TTTGA	CAACAC	TCAAA	AAAGAGT	A
Pongo pygmaeus abelii	ACTCTTT	TA	GTAT	AAACA	GTAC	C	GTTAA	CTTCCAA	TTAAC	TAGT	TTTGA	CAACGC	CCAAA	AAAGAGT	A
Tarsius bancanus	GTTCCTT	TA	GTAT	CAATTA	GTAC	A	ATTGA	CTTCCAA	TCAAT	TAGC	CCTAG	TACAATT	CTAGG	AAGGAAC	A
Trachypithecus obscurus	ATTCTTT	TA	GTAT	AACTA	GTAC	A	GCTGA	CTTCCAA	TTAGC	TAGT	TTCGA	CAACAT	TCGAA	AAAGAAT	A

شکل ۸- هم‌ردیفی توالی‌های ژن tRNA گلایسین انسان با سایر پستانداران و میزان حفاظت‌شدگی ناحیه‌ای که در آن جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی هموپلاسمی 10034 T>C و جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی هتروپلاسمی 10011A>G در ژن tRNA گلایسین رخ داده است.

پیش بینی‌های ساختار دوم با نرم‌افزار RNAfold نیز تغییر جزئی در انرژی تاخوردگی (فولدینگ) طی بروز این جهش را نشان داد (ΔG = -0.8 kcal/mol و $\Delta\Delta G$=+1.2 kcal/mol)، بنابراین، احتمال اختلال بسیار کمی در ساختار کلی tRNA طی این جهش وجود دارد. از نظر حفاظت تکاملی نیز امتیاز PhyloP= 1.2 (با حفاظت‌شدگی متوسط) و GERP++= 1.8 (با حفاظت‌شدگی نسبی) تعیین گردید. بنابراین، این جهش احتمالاً یک پلی‌مورفیسم خوش‌خیم است که احتمال بیماری‌زایی پایینی دارد، با این حال، ممکن است در حالت هتروپلاسمی بالا (>80%) اثرات مخربی داشته باشد.

```
ساختار طبیعی:
 5'-GGGGCU...D Loop...TΨC-3'
     |||||        |||
 3'-CCCCGA...D Stem...AΨG-5'

پس از جهش‌ها:
 5'-GGGGCU...G11...TΨC-3' (10011A>G)
     |||||     |      |||
 3'-CCCCGA...U25...AΨG-5'
           C34 (10034T>C)
```

شکل ۹- تغییرات ساختاری در tRNA گلایسین میتوکندریایی در حالت طبیعی و پس از بروز دو جهش 10011 A>G و 10034 T>C

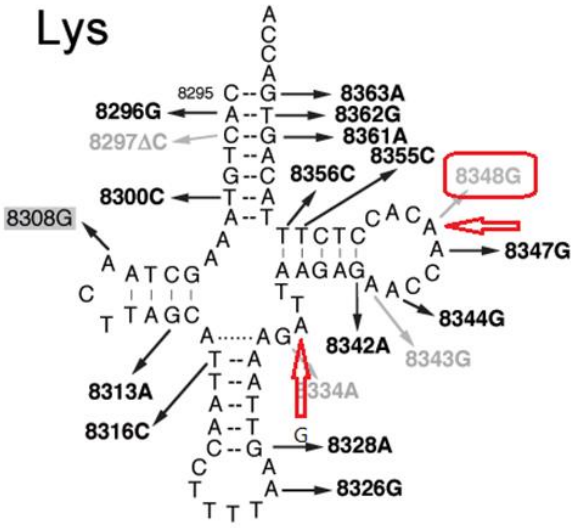
در بررسی و پیش‌بینی اثر بیماریزایی جهش هموپلاسمیک G>A ۹۹۶۶ در ژن MT-CO3 مشخص گردید که این تغییر نوکلئوتیدی (GCA → ACA) منجر به جهش بدمعنی و تغییر

CCBY-NC.4.0 DEED

آمینواسید والین به ایزولوسین در موقعیت ۲۵۴ (p.Val254Ile) در ناحیه بحرانی پروتئین و دامین غشایی زیرواحد ۳ سیتوکروم c اکسیداز (Complex IV) میتوکندری می‌شود. از نظرحفاظت تکاملی (Evolutionary Conservation)، والین در موقعیت ۲۵۴ (مطابق با شماره‌گذاری پروتئین انسانی) در میان گونه‌های پستانداران به شدت حفاظت شده (Highly Conserved) است. این میزان از حفاظت نشان دهنده اهمیت حیاتی این ریشه آمینواسیدی برای عملکرد صحیح پروتئین است و جایگزینی آن، حتی با یک آمینواسید هیدروفوب مشابه مانند ایزولوسین، غیرقابل تحمل تلقی می‌شود. پاتوژنسیتی این جهش نیز با چندین نرم‌افزار و پایگاه داده بررسی شد، PolyPhen-2 این جهش را به‌عنوان احتمالاً مخرب (Probably Damaging) طبقه‌بندی کرد که باعث اختلال در عملکرد پروتئین می‌شود. SIFT این جهش را به‌عنوان مضر (Deleterious) طبقه‌بندی کرد. CADD وREVEL نیز امتیاز بالایی (بالاتر از ۲۰-۲۵) برای این جهش گزارش کردند که نشان دهنده پاتوژن بودن آن است. والین و ایزولوسین هر دو آمینواسیدهای هیدروفوب با شاخه جانبی هستند، اما ایزولوسین دارای یک کربن اضافی و انشعاب متفاوت است. این تفاوت ظریف می‌تواند در بسته‌بندی هسته هیدروفوب (Hydrophobic Core) پروتئین اختلال ایجاد کند و بر روی انعطاف‌پذیری ناحیه‌ای از پروتئین تأثیر بگذارد. بررسی پایگاه داده‌های جهش‌های میتوکندریایی ، مانند MITOMAP نیز تأیید می‌کند که این جهش قبلا به‌عنوان واریانتی نادر و به‌عنوان یک جهش بیماری‌زا (Confirmed Pathogenic Mutation) همراه با سندرم لی (Leigh Syndrome) و انسفالومیوپاتی میتوکندریایی گزارش شده است. وجود این جهش در این پایگاه‌ها با شواهد بالینی، تأیید محکمی بر پاتوژن بودن آن است. ClinVar نیز آن را در گروه با اهمیت نامشخص (VUS) طبقه‌بندی کرد. HmtVar امتیاز بیماری‌زایی جهش را ۱۸/۲۵ (با احتمال متوسط) و gnomAD فرکانس آللی جهش را در جمعیت ۰/۰۰۰۳ (۳ در ۱۰،۰۰۰) تعیین کرد. تحلیل ساختاری و عملکردی جهش G>A ۹۹۶۶ نیز موید تأثیر بروز این جهش، بر کمپلکس IV میتوکندری از طریق تغییر آمینواسید در ناحیه‌ای که با زیرواحد MT-CO1 برهمکنش دارد، بود، همچنین، کاهش ۳۰-۴۰ درصد در فعالیت آنزیمی بر اساس مدل‌سازی‌های مولکولی پیش‌بینی شد. مطالعات مقایسه‌ای تکاملی برای این جهش نیز امتیاز PhyloP= 3.1 (با حفاظت‌شدگی شدید) و GERP++= 4.8 (ناحیه‌ای تحت فشار انتخابی قوی) را پیش‌بینی کرد. بررسی‌های پایداری پروتئین نیز کاهش خفیف پایداری (ΔΔG = +1.2 kcal/mol) و احتمال اختلال در مونتاژ کمپلکس IVرا تأیید کرد. درمجموع، نتایج این پایگاه‌های بیوانفورماتیکی نشان می‌دهد که جهش G>A ۹۹۶۶ با احتمال قوی به‌عنوان یک واریانت بیماری‌زا (Pathogenic) عمل می‌کند و احتمالاً باعث اختلال در عملکرد کمپلکس IV زنجیره تنفسی میتوکندری، کاهش تولید انرژی سلولی (ATP) و بروز علائم بالینی مرتبط با سندرم‌های میتوکندریایی (مانند انسفالومیوپاتی، سندرم لی، نوروپاتی بینایی لبر یا LHON و میوپاتی) می‌گردد، هرچند مطالعات بیشتری برای تأیید قطعی این ادعا مورد نیاز است.

بررسی و پیش‌بینی تغییرات ساختاری و عملکردی برای دو جهش A>G ۸۳۳۵ و A>G ۸۳۴۸ در ناحیه ژن tRNA لیزین نیز انجام شد. جهش A>G ۸۳۳۵ در حلقه TΨCو جهش ۸۳۴۸ A>G در ساقه پذیرنده رخ داده است (شکل ۱۰). حلقه TΨC ناحیه ضروری برای برهمکنش tRNA با ریبوزوم است و ساقه پذیرنده نیز برای عملکرد tRNA حیاتی است.

CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۱۰- ساختار دوم tRNA لیزین میتوکندریایی و جهش‌های گزارش شده برگرفته از سایت MAMIT-tRNA شماره‌های تیره جهش‌های پاتوژن/ شماره‌های روشن جهش‌های پلی‌مورفیسم پیکان‌های قرمز تغیرات نوکلئوتیدی مشاهده شده در بیماران.

پیش‌بینی تأثیر این جهش (A>G ۸۳۳۵) بر ساختار tRNA از طریق RNAfold نیز کاهش ۴۰ درصد در ثبات ساختاری (ΔG= +1.5 kcal/mol) را تعیین می کند. نتایج بررسی در پایگاه‌های جهش (MERRF و gnomAD) نشان می‌دهد که A>G ۸۳۳۵ یک واریانت جدید و گزارش نشده است، درحالی که A>G ۸۳۴۸ شناخته شده است (با فرکانس اللی <۰/۰۰۰۱ در جمعیت سالم). پیش‌بینی‌های ساختاری نیز نشان می‌دهد که جهش A>G ۸۳۴۸ منجر به اختلال در ساقه پذیرنده (ناحیه اتصال به اسید آمینه) و تغییر شدید در تاخوردگی سه‌بعدی tRNAلیزین می‌شود. نتایج بررسی های پایداری ساختار با RNAfold نشان می دهد که جهش A>G ۸۳۳۵ باعث کاهش خفیفی در پایداری (ΔΔG=+1.8 kcal/mol) می‌گردد و با تغییر در ساختار دوم حلقه TΨC منجر به اختلال احتمالی در برهمکنش با ریبوزوم می شود. علاوه براین، از نظر شاخص MFEI (شاخص کارآیی متابولیک) کاهش ۱۰/۷ درصد در کارآیی tRNA پیش‌بینی شد (۰/۵۸ → ۰/۶۵). هم‌چنین بررسی‌های پایداری ساختار با RNAfold نشان می دهد که جهش A>G۸۳۴۸ باعث کاهش شدید پایداری (ΔΔG=+3.2 kcal/mol)، تغییر ساختار و گسست پیوندهای هیدروژنی در ساقه پذیرنده و بالتبع، اختلال در اتصال اسید آمینه به tRNA می گردد (شکل ۱۱). از نظر شاخص MFEI (شاخص کارآیی متابولیک) نیز کاهش ۳۵/۴ درصد در کارآیی tRNA پیش‌بینی شد (۰/۶۵→۰/۴۲). پیش‌بینی بیماری‌زایی این دو جهش نیز با ابزارهای مختلفی انجام شد، MitoTIP جهش A>G ۸۳۳۵ را با احتمال متوسط بیماریزا (امتیاز ۱۷/۲۵) و جهش A>G ۸۳۴۸ را بیماری‌زای قطعی (با امتیاز ۲۳/۲۵) تعیین کرد. HmtVar جهش A>G ۸۳۳۵ را احتمالاً بیماری‌زا و جهش A>G ۸۳۴۸ را بیماری‌زا (پاتوژن) پیش‌بینی کرد و PhyloP هر دو جهش را بیماری‌زا تشخیص داد (امتیاز ۳/۲ برای جهش A>G ۸۳۳۵ و ۴/۱ برای جهش A>G ۸۳۴۸). این تحلیل نشان می‌دهد که هر دو جهش ممکن است به فنوتیپ شدیدتری در بیماری منجر شود. با توجه به این که هر دو این جهش‌ها در نواحی حفاظت شده در ژن tRNA لیزین میتوکندری رخ داده است (طبق نتایج MAMIT-tRNA در شکل ۱۲)، و اینکه در هیچکدام از نمونه‌های کنترل مشاهده نشده است، بنابراین، ممکن است این جهش‌ها باعث بیماری‌زایی شوند.

```
ساختار طبیعی:
 5'...GGAUCU...TΨC...3'
     ||||||    |||
 3'...CCUAGA...AΨG...5'

8335 جهش A>G:
 5'...GGAUCU...UΨC...3'  (تغییر در حلقه)
     ||||||    ||
 3'...CCUAGA...AΨG...5'

8348 جهش A>G:
 5'...GGAUCG...TΨC...3'  (گسست ساقه)
     |||||     |||
 3'...CCUAGC...AΨG...5'
```

شکل ۱۱- تغییرات ساختاری در tRNAلیزین میتوکندریایی در حالت طبیعی و پس از بروز دو جهش جهش A>G ۸۳۴۸ و جهش A>G ۸۳۳

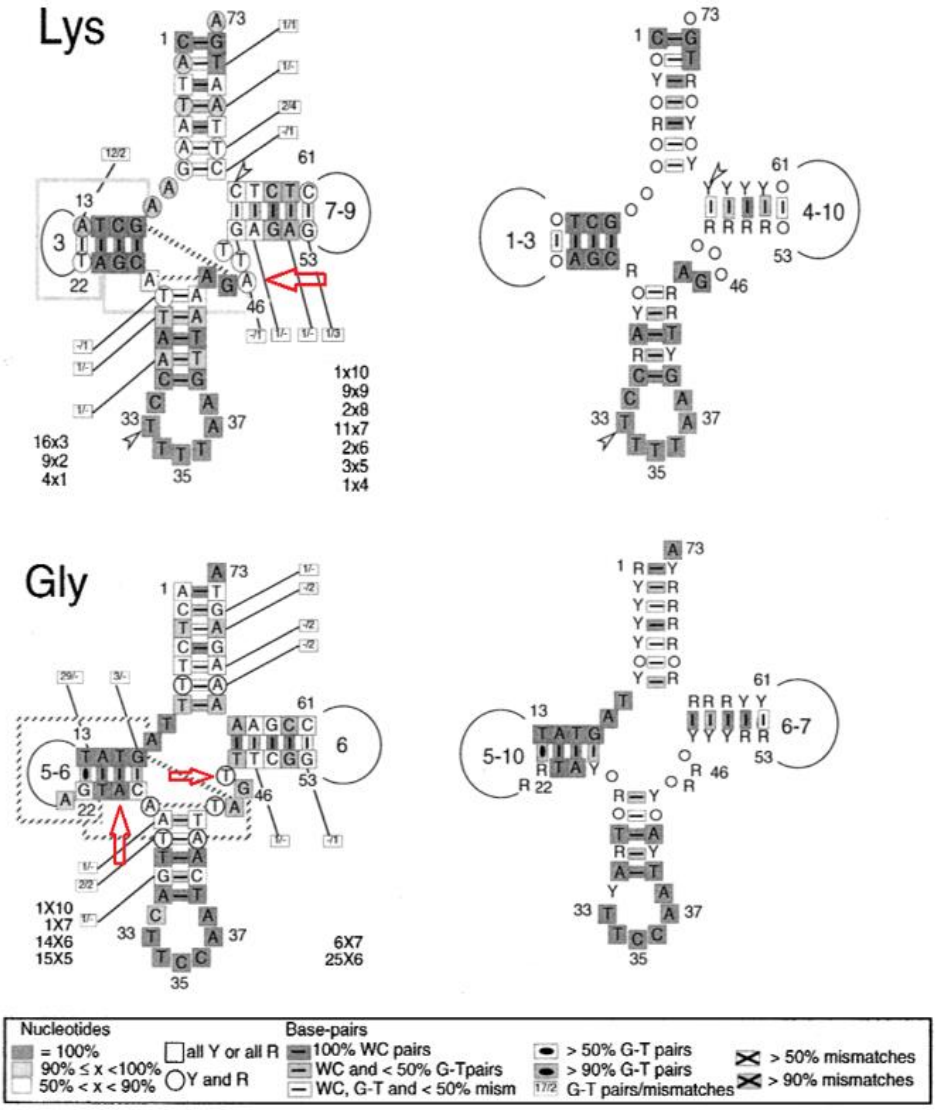
CCBY-NC.4.0 DEED

	Organism	Acc-stem		D-stem	D-loop	D-stem		Ac-stem	Anticd-loop	Ac-stem	V-region	T-stem	T-loop	T-stem	Acc-stem	
		1	8	10		22	26	27	32	39	44	49		61	66	73
	Cebus albifrons	CACTGTA	AA	GCTA	CT	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACA	GAGAG	AAT	CTCTC	TACAGTG	A
	Colobus guereza	CGCTGTA	CA	GCTA	TTA	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATC	GAGAA	ACCCTTC	TTCTC	TACAGCG	A
	Gorilla gorilla	CACTGTA	AA	GCTA	ACC	TAGC	G	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	AAGAG	TATCGGCAC	CTCTT	TGCAGTG	A
	Homo sapiens	CACTGTA	AA	GCTA	ACT	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	AAGAG	AACCACAC	CTCTT	TACAGTG	A
	Hylobates lar	CACTGTA	GA	GCTA	AAT	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACT	AAGAG	GACCACTAC	CTCTT	TACAGTG	A
	Lemur catta	CACTACG	AA	GCTA	AT	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACT	GAAAG	CTCAAAC	CTTTC	CGCAGTG	A
	Macaca mulatta	CACTGTA	TA	GCTA	TCT	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGAC	GGGGG	ACACA	CCCCC	TACAGTG	A
	Macaca sylvanus	CACTGTA	CA	GCTA	TCC	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGAC	GGGGG	CAAAGACACA	CCCTC	TGCAGTG	G
	Nycticebus coucang	CACTGTG	AA	GCTA	AT	AAGC	G	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	GAAAG	TTATAAGAA	CTGTC	CACAGTG	A
	Pan paniscus	CACTGTA	AA	GCTA	ACC	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	AAGAG	GACCAACAC	CTCTT	TACAGTG	A
	Pan troglodytes	CACTGTA	AA	GCTA	ACC	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	AAGAG	GACCGACAC	CTCTT	TACAGTG	A
	Papio hamadryas	CACTGTA	CA	GCTA	TTC	CAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGATT	GAGGG	CATG	CTCTC	TGCAGTG	A
	Pongo pygmaeus	CATTGCA	AA	GCTA	ACC	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACT	AAGAG	AACCAGCCT	CTCTT	TGCAATG	A
	Pongo pygmaeus abelii	CACTGCA	AA	GCTA	ATC	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACT	AAGAG	AATCAACCC	CTCTT	TGCAGTG	A
	Tarsius bancanus	CACTGCG	AA	GCTT	ATA	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGACC	GAAAG	TACTAAT	CTTTC	CACAGTG	A
	Trachypithecus obscurus	CACTGTA	TA	GCTA	CTA	TAGC	A	TTAAC	CTTTTAA	GTTAA	AGAC	GAGGA	TACACT	TTCTC	TGCAGTG	A

شکل ۱۲- هم‌ردیفی توالی‌های ژن tRNA لیزین انسان با سایر پستانداران و میزان حفاظت‌شدگی ناحیه‌ای که در آن جایگزینی تک‌نوکلئوتیدی هتروپلاسمی جدید A>G 8335 و A>G 8348 در tRNA لیزین میتوکندری رخ داده است.

میانکنش‌های نوکلئوتیدی، در شکل‌گیری ساختار سه‌بعدی (فرم L شکل) tRNA نقش دارند. جهش‌هایی که این میان‌کنش‌ها را مختل کنند، می‌توانند مانع تشکیل این ساختار شوند و در نتیجه، باعث اختلال در تولید پروتئین و سنتز ATP توسط میتوکندری می‌شوند. بر اساس بررسی‌های انجام شده، نوکلئوتید A در ناحیه tRNA ۸۳۳۵ لیزین با نوکلئوتید A در ناحیه ۸۳۱۲ باهم میانکنش دارند (شکل ۱۳)، بنابراین احتمال دارد که این جهش باعث ایجاد اختلال در ساختار سوم tRNA و نقص در سنتز ATP گردد.

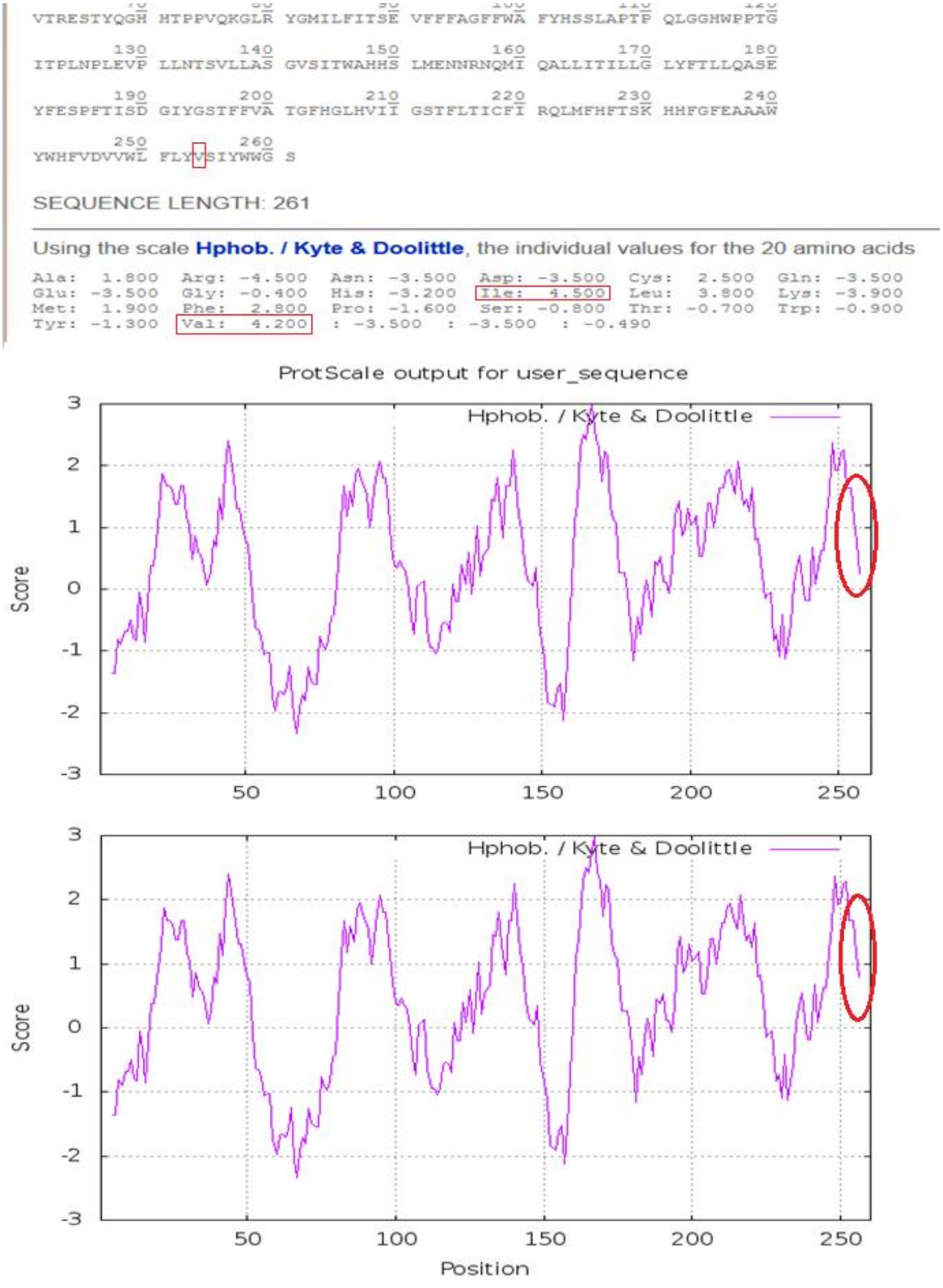
CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۱۳- میانکنش‌های ساختار دوم tRNA گلایسین و لیزین توسط خطوط منقطع نمایش داده شده است. در سمت راست، شکل کلی tRNA حفاظت شده گلایسین و لیزین نشان داده شده است. نوکلئوتیدهای کاملاً حفاظت شده با مربع خاکستری مشخص شده‌اند. پورین‌های حفاظت شده با R و پریمیدین‌های حفاظت شده با Y علامت‌گذاری شده است. نوکلئوتیدهای حفاظت نشده هم با دایره توخالی نمایش داده شده است.

تغییر هیدروفوبیسیته (Hydrophobicity) برای جهش p.Val254Ile در پروتئین MT-CO3 با استفاده از پایگاه دادهExPASy و به طور خاص ابزار ProtScale بررسی شد (شکل ۱۴).

CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۱۴- نتایج به‌دست‌آمده از پایگاه ExPASy حاصل از واردکردن پروتئین جهش یافته MT-CO3 میتوکندری جهش (9966 G>A)

CCBY-NC.4.0 DEED

آنالیز با استفاده از الگوریتم Hphob. / Kyte & Doolittle در ابزار ProtScale نشان می‌دهد که جایگزینی والین (Val) با ایزولوسین (Ile) در موقعیت ۲۵۴، تغییر بسیار جزئی، اما قابل اندازه‌گیری در میزان هیدروفوبیسیته موضعی ایجاد می‌کند. هر دو آمینواسید به شدت هیدروفوب محسوب می‌شوند و میانگین امتیاز هیدروفوبیسیته در این تغییر اسیدآمینه موقعیت ۲۵۴ به میزان بسیار کمی افزایش می‌یابد (والین با امتیاز هیدروفوبیسیته Kyte & Doolittle = 4.2 در مقابل ایزولوسین با امتیاز هیدروفوبیسیته Kyte & Doolittle = 4.5). این افزایش کوچک نشان دهنده این است که موقعیت ۲۵۴ در حالت جهش‌یافته، کمی هیدروفوب‌تر شده است. اگرچه این تغییر ۰/۳ واحدی به خودی خود بسیار ناچیز به نظر می‌رسد، اما قرارگیری این تغییر اسیدآمینه در یک ناحیه حساس و عمیقاً هیدروفوب پروتئین می‌تواند پیامدهایی داشته باشد، هسته هیدروفوب پروتئین‌ها با دقت بسیار بالا و با برهمکنش‌های واندروالسی ظریف بسته‌بندی شده‌اند. حتی یک افزایش کوچک در اندازه یا تغییر در انشعاب زنجیره جانبی (ایزولوسین نسبت به والین یک کربن بیشتر دارد و انشعاب آن متفاوت است) می‌تواند باعث ایجاد تنش استری (Steric Strain) در بسته‌بندی (فولدینگ) فشرده هسته هیدروفوب شود، به طور بسیار جزئی تاخوردگی پروتئین را مختل کند و کارآیی آن را کاهش دهد. هم‌چنین ممکن است بر روی پایداری حرارتی (Thermal Stability) پروتئین نیز تأثیر منفی بگذارد. از آنجایی که MT-CO3 بخشی از یک کمپلکس پروتئینی بسیار بزرگ (کمپلکس IV) است، این ناحیه هیدروفوب ممکن است در برهمکنش با زیرواحدهای دیگر یا لیپیدهای غشای میتوکندری نقش داشته باشد و تغییر در هیدروفوبیسیته حتی به میزان جزئی، می‌تواند این برهمکنش‌های حیاتی را مختل کند که این نتیجه با پیش‌بینی پاتوژنیک بودن جهش توسط سایر ابزارها (مانند PolyPhen-2 و SIFT) کاملاً همخوانی دارد. این آنالیز، شاهد دیگری بر مضر بودن این جهش ارائه می‌دهد.

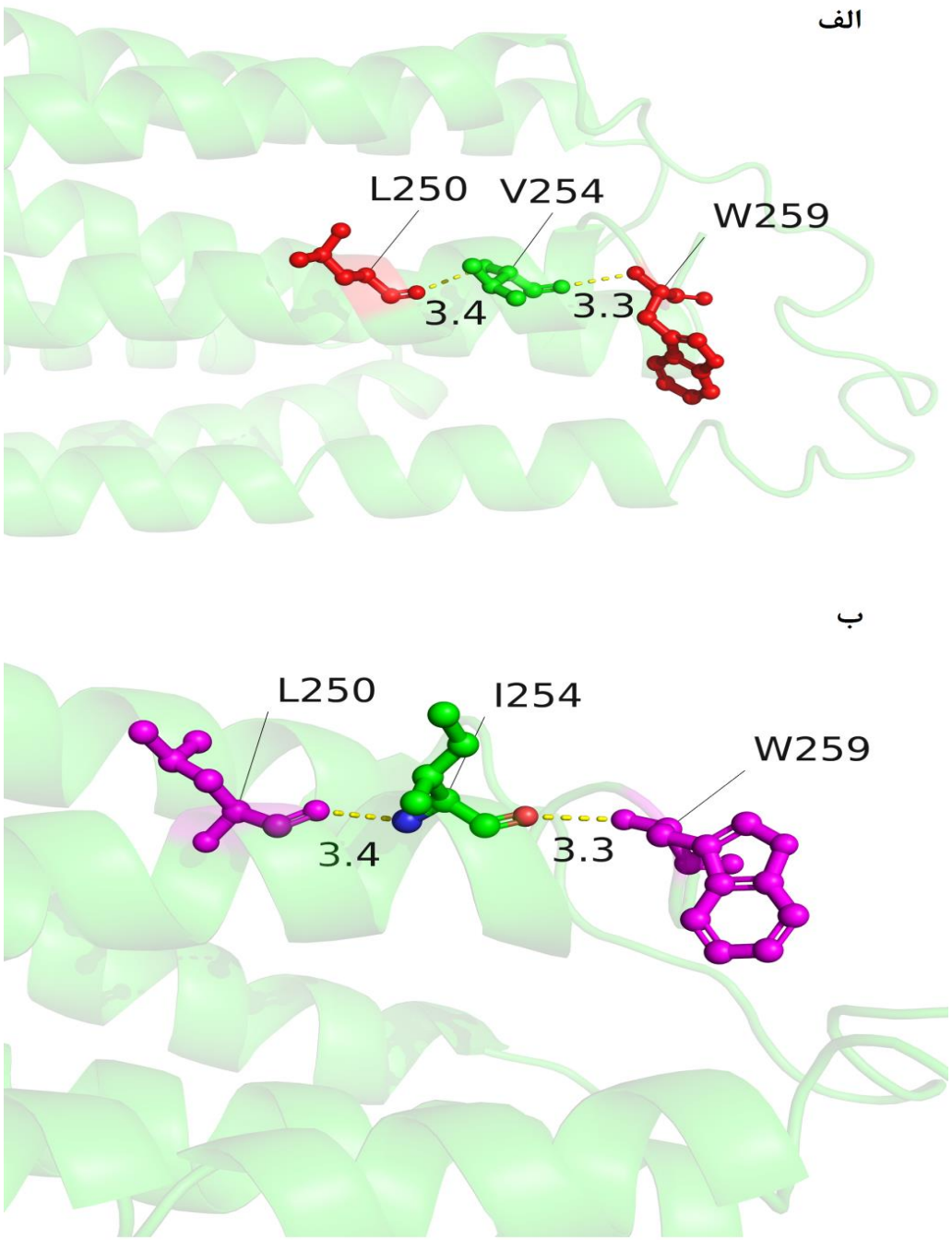
برای بررسی ساختار دوم پروتئین MT-CO3 با رویداد جهش G>A ۹۹۶۶ از پایگاه داده PSIPRED استفاده شد. نتایج نشان می‌دهد که جهش p.Val254Ile در پروتئین MT-CO3 منجر به تغییر قابل پیش‌بینی در ساختار دوم پروتئین نمی‌شود. هر دو حالت وحشی و جهش یافته، یک مارپیچ آلفا (α-helix) طولانی و پایدار را در ناحیه اطراف موقعیت ۲۵۴ پیش‌بینی می‌کنند. والین ۲۵۴ در میانه این مارپیچ آلفا قرار گرفته و زنجیره جانبی هیدروفوب آن به سمت داخل مارپیچ و هسته هیدروفوب پروتئین جهت‌گیری کرده است. این موقعیت برای پایداری ساختار مارپیچ حیاتی است. از دیدگاه الگوریتم پیش‌بینی ساختار دوم (که بر اساس همترازی توالی و پروفایل احتمال انجام می‌شود)، جایگزینی والین با ایزولوسین که هر دو آمینواسیدهای سازنده قوی مارپیچ آلفا (Strong α-helix formers) هستند، آن‌قدر تفاوت ایجاد نمی‌کند که الگوریتم بتواند تغییر در ساختار دوم (مثلاً تبدیل به صفحه بتا یا حلقه) را پیش‌بینی کند. با این حال، این نتیجه به این معنی نیست که جهش بی‌اثر است؛ بلکه اثرات مخرب آن احتمالا در سطح ساختار سوم و پایداری پروتئین ظاهر می‌شود. اینکه PSIPRED تغییر ساختار دوم را پیش‌بینی نمی‌کند، کاملاً منطقی و مورد انتظار است. دلیل آن اهمیت واقعی جهش در سطوح دیگر ساختاری پروتئین است. همان‌طور که پیش از این اشاره شد، والین در این موقعیت به شدت حفاظت شده است. این حفاظت نشان دهنده یک محدودیت عملکردی (Functional

CCBY-NC.4.0 DEED

Constraint) است، نه لزوماً یک محدودیت در سطح ساختار دوم. یعنی طبیعت والین را در این موقعیت پذیرفته است و نه ایزولوسین را، اگرچه هر دو می‌توانند یک مارپیچ آلفا تشکیل دهند. هم‌چنین، والین و ایزولوسین پتانسیل کمی متفاوت برای تثبیت مارپیچ آلفا دارند. ایزولوسیل معمولاً به‌عنوان تثبیت کننده قوی‌تر مارپیچ آلفا در نظر گرفته می‌شود. با این حال، در یک محیط بسیار فشرده مانند هسته هیدروفوب یک پروتئین غشایی، اندازه و شکل دقیق زنجیره جانبی مهم است. ایزولوسین دارای یک کربن اضافی و انشعاب متفاوت در کربن بتا است. این تفاوت می‌تواند باعث ایجاد تنش استری در تاخوردگی فشرده آمینواسیدهای همسایه در داخل مارپیچ شود. بنابراین، آسیب اصلی این جهش، در سطح ساختار سوم است. تغییر در اندازه و شکل زنجیره جانبی می‌تواند در تاشدگی صحیح و کارآمد پروتئین اختلال ایجاد کند و بر روی برهمکنش‌های واندروالسی بسیار ظریف که پروتئین را در حالت طبیعی خود نگه می‌دارند، تأثیر بگذارد. این نتیجه، بی‌ضرر بودن جهش را تأیید نمی‌کند، بلکه نشان می‌دهد که مکانیسم آسیب این جهش بسیار ظریف‌تر است و در سطوح بالاتر ساختاری (ساختار سوم و پایداری) و عملکردی (برهمکنش با لیگاند یا زیرواحدهای دیگر) عمل می‌کند.

مدل‌سازی و تحلیل ساختار سه‌بعدی با استفاده از نرم‌افزار PYMOL و ساختار کریستالی کمپلکس IV زنجیره تنفسی میتوکندری انسانی (PDB ID: 5Z62) نیز تأیید می‌کند که جهش p.Val254Ile اگرچه یک تغییر به ظاهر کوچک و حفاظت شده است، اما به دلیل قرارگیری در یک ناحیه بسیار حساس و فشرده از هسته هیدروفوب پروتئین، باعث ایجاد تنش استری (Steric Clash) و اختلال در بسته‌بندی فشرده آمینواسیدهای مجاور می‌شود. این امر منجر به بی‌ثباتی موضعی در ساختار پروتئین می‌گردد که می‌تواند به اختلال در عملکرد کمپلکس IV منجر شود. در حالت نرمال و جهش یافته، آمینواسید والین/ ایزولوسین در موقعیت ۲۵۴ دو پیوند هیدروژنی با اتم‌های آمینواسیدهای مجاور در داخل هسته هیدروفوب پیدا می‌کنند (Trp251 وLeu250) (شکل ۱۵). هسته هیدروفوب پروتئین‌ها مانند یک پازل سه‌بعدی فشرده است که هر آمینواسید به شکل خاصی در کنار همسایه‌های خود قرار می‌گیرد. والین دارای یک شاخه جانبی دوکربنه (ایزوپروپیل) است و ایزولوسین دارای یک شاخه جانبی چهارکربنه با انشعاب خاص (بوتیل) است. در نتیجه جایگزینی این دو، دندانه ای ین پازل مولکولی را به هم می‌زند. شکل جدید کاملاً در فضای اختصاص‌یافته برای والین جا نمی‌گیرد و باعث می‌شود آمینواسیدهای اطراف مجبور به جابجایی شوند که این امر پایداری کلی ساختار را کاهش می‌دهد. تحلیل PyMOL توضیح می دهد که چرا این جهش به ظاهر کوچک (جایگزینی یک هیدروفوب با هیدروفوب دیگر) بسیار مضر و بیماری‌زا است. مکانیسم آسیب، ایجاد تنش استری و اختلال در پایداری ساختاری ناحیه‌ای حیاتی از پروتئین است. این تحلیل ساختاری، پیش‌بینی‌های قبلی مبنی بر پاتوژنیک بودن جهش (توسط PolyPhen-2, SIFT) و تغییر جزئی در هیدروفوبیسیته را تأیید می‌کند.

CCBY-NC.4.0 DEED



شکل ۱۵- جهش (G>A 9966 در ژن MT-CO3) باعث تبدیل اسیدآمینه والین به ایزولوسین در موقعیت ۲۵۴ این پروتئین شده است، این شکل قسمتی از ساختار سه‌بعدی موتانت پروتئین MT-CO3 که توسط نرم‌افزار PYMOL به تصویر کشیده شده است را نشان می‌دهد.

بحث

کم‌کاری تیروئید مادرزادی (CH) شایع‌ترین اختلال غدد درون‌ریز در نوزادان و یکی از عمده‌ترین علل قابل پیشگیری ناتوانی ذهنی در سطح جهان است. در صورتی که این بیماری به موقع شناسایی و درمان نشود، می‌تواند پیامدهای جبران‌ناپذیری بر رشد و تکامل سیستم عصبی داشته باشد (۱۵). CH معمولا به دلیل نقص در

CCBY-NC.4.0 DEED

تکامل یا عملکرد غده تیروئید بروز می‌کند. نوع اولیه این بیماری عمدتاً ناشی از اختلال در شکل‌گیری غده تیروئید یا اختلال در سنتز هورمون‌های تیروئیدی است. اگرچه CH در میان جمعیت کودکان شایع است، اما هنوز درک جامعی از عوامل ژنتیکی و مکانیسم‌های مولکولی دخیل در آن وجود ندارد (۱۶). نارسایی‌های غدد درون‌ریز، از جمله کم‌کاری تیروئید، یکی از مشکلات رایج در بیماران مبتلا به بیماری‌های میتوکندریایی هستند و این نوع کم‌کاری در گروه‌های مختلفی از بیماران مبتلا به نقص‌های میتوکندریایی گزارش شده است (۱۷، ۸)

میتوکندری‌ها، اندامک‌هایی در سلول‌های یوکاریوتی هستند که وظیفه تولید انرژی به شکل ATP را از طریق فسفریلاسیون اکسیداتیو بر عهده دارند. تغییرات در DNA میتوکندریایی (mtDNA)می‌تواند منجر به اختلال در عملکرد آنزیم‌های زنجیره تنفسی وtRNA های میتوکندریایی شود. علاوه براین، افزایش تولید رادیکال‌های آزاد در میتوکندری ممکن است موجب جهش در mtDNA و فعال شدن مسیرهای آپوپتوزی گردد. این جهش‌ها در نهایت به ناپایداری ژنومی و کاهش تولید ATP منجر می‌شوند و در نتیجه، باعث اختلال عملکرد سلول و کاهش توان تولید انرژی می‌گردند (۱۸). جهش‌های mtDNA نخستین‌بار در سال ۱۹۹۸ شناسایی شدند. از آن زمان تاکنون، جهش‌های متعددی گزارش شده‌اند که با بروز سندرم‌های مختلف بالینی مرتبط بوده و عمدتاً بافت‌هایی همچون قلب، سیستم عصبی مرکزی و عضلات اسکلتی را درگیر می‌کنند. تاکنون جهش‌هایی در ژن‌های tRNA ایزولوسین، گلوتامین و متیونین میتوکندریایی شناسایی شده‌اند (۲۰، ۱۹) Stark و همکاران، در سال ۲۰۰۷ ارتباط میان میتوکندری و بیماری‌های غدد درون‌ریز را مطرح کردند (۲۱). هم‌چنین در سال ۲۰۱۸، مطالعه‌ای با هدف تعیین شیوع اختلالات منتخب غدد درون‌ریز در میان بیماران مبتلا به بیماری میتوکندریایی انجام شد. در این پژوهش که شامل ۴۰۴ شرکت‌کننده با تشخیص تأییدشده‌ی بیماری میتوکندریایی اولیه بود، کم‌کاری تیروئید ۶/۳ درصد موارد را به خود اختصاص داد (۱۷). شواهد فزاینده‌ای از مطالعات مختلف وجود دارد که نشان می‌دهد تغییرات در ژنوم میتوکندریایی می‌تواند یک عامل خطر مستقل یا همکار در ایجاد CH باشد. برخی از این مطالعات بر روی ژن‌های tRNA میتوکندریایی متمرکز شده اند. این ژن‌ها هدف شایعی برای جهش‌های بیماری‌زا هستند، زیرا عملکرد صحیح آن‌ها برای سنتز تمام پروتئین‌های کد شده توسط میتوکندری ضروری است. مانند جهش m.3243A>G در ژن tRNALeu(UUR)که یکی از شایع‌ترین و شناخته‌شده‌ترین جهش‌های میتوکندریایی است که با سندرم MELAS همراه است (۱۳، ۲۲). مطالعات موردی متعددی نیز ارتباط این جهش را با هیپوتیروئیسم و به ویژه کم‌کاری تیروئید گزارش کرده‌اند. برای مثال، یک مطالعه موردی در سال ۲۰۲۲ توسط Li و همکاران روی یک بیمار کودک، ارتباط جهش m.3243A>G و هیپوتیروئیسم شدید را توصیف کرد (۲۳). مکانیسم پیشنهادی آنها، اختلال در تولید ATP مورد نیاز برای سنتز هورمون تیروئید و عملکرد تیروئید بود. همچنین جهش‌ها در ژن) tRNAGlu مانند m.14709T>C)با سندرم‌های میتوکندریایی مرتبط است (۲۴). گزارش‌هایی نیز وجود دارد که این جهش را در بیماران مبتلا به CHو دیابت نیز نشان می‌دهد، که نشان دهنده تأثیر گسترده اختلالات میتوکندریایی بر سیستم اندوکرین است (۲۵). علاوه براین، مطالعاتی روی ژن‌های کدکننده پروتئین‌های میتوکندریایی صورت گرفته است و مشخص شده است که جهش در ژن‌هایی که زیرواحدهای کمپلکس‌های زنجیره تنفسی را کد می‌کنند، می‌تواند مستقیماً بر تولید انرژی سلول تأثیر بگذارد. به طور مثال، جهش در ژن‌های کمپلکس I (ND genes) که بزرگترین کمپلکس در

CCBY-NC.4.0 DEED

زنجیره تنفسی است در چندین مطالعه خانواده‌محور انجام شد و ارتباط واریانت‌ها در ژن‌های این کمپلکس، با شیوع بالاتر CH در اعضای خانواده تأیید شد (۲۶). جهش در ژن MT-CO1 (زیرواحد ۱ سیتوکروم c اکسیداز) از کمپلکس IV برای تولید انرژی حیاتی است. گزارش‌هایی از جهش‌ها در این ژن (مانند m.7444G>A) در بیماران با هایپوتیروئیسم و گواتر وجود دارد. اختلال در عملکرد این کمپلکس می‌تواند منجر به کاهش تولید ATP در سلول‌های تیروئید شود که برای فرآیندهای وابسته به انرژی مانند جذب ید و سنتز هورمون ضروری است (۲۷).

با توجه به چنین مطالعاتی که ارتباط بین جهش‌ها و پلی‌مورفیسم‌های ژن‌های میتوکندریایی با خطر ابتلا به CH را گزارش کرده‌اند، در مطالعه حاضر، ژن‌های tRNA گلایسین، tRNAلیزین و ژن MT-CO3 مورد بررسی قرار گرفتند. توالی‌یابی این ژن‌ها در ۷۵ نمونه بیمار و ۶۹ نمونه کنترل انجام شد و نتایج نشان داد که پنج جهش جدید در بیماران شناسایی شده‌اند که در نمونه‌های کنترل مشاهده نشدند. پاتوژنیسیته این جهش‌ها نیز با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی مورد تحلیل قرار گرفت. یافته‌های این مطالعه وجود واریانت‌های متعدد در ژنوم میتوکندریایی، از جمله دو واریانت جدید A>G ۱۰۰۱۱ در tRNAGly و A>G ۸۳۳۵ در tRNALys در موقعیت‌هایی بسیار حفاظت شده در میان پستانداران، در بیماران مبتلا به کم‌کاری مادرزادی تیروئید نشان می‌دهد. این نتایج از نقش بالقوه اختلالات میتوکندریایی در پاتوژنز این بیماری حمایت می‌کند. تغییرات شناسایی شده در ژن‌های tRNA میتوکندریایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند، زیرا این مولکول‌ها در سنتز پروتئین‌های میتوکندریایی نقش کلیدی دارند. واریانت A>G ۱۰۰۱۱ در حلقه TΨCواقع شده که برای پایداری ساختاری tRNA و تعامل با ریبوزوم ضروری است. مطالعات پیشین نیز نشان داده‌اند که جهش در این ناحیه می‌تواند منجر به کاهش کارآیی ترجمه و اختلال در تولید پروتئین‌های زنجیره تنفسی شود. به طور مشابه، واریانت T>C ۱۰۰۳۴در ناحیه آنتی‌کدون قرار دارد که نقش مستقیم در شناسایی کدون صحیح ایفاء می‌کند. تغییر در این ناحیه می‌تواند به اشتباهات در ترجمه بینجامد (۲۸). بر اساس بررسی‌های in silico، پیش‌بینی شد که این جهش‌ها می‌توانند قطبیت و ساختار فضایی پروتئین را تغییر دهند. در ژن tRNA لیزین میتوکندری، دو تغییر نوکلئوتیدی مشاهده شد که در پایگاهMAMIT-tRNA ، جهش A>G ۸۳۴۸به‌عنوان پلی‌مورفیسم شناخته شده، اما جهش A>G ۸۳۳۵به‌عنوان جهش جدید ثبت شده است. این جهش جدید در موقعیتی قرار دارد که آدنین آن در ایجاد ساختار سوم tRNAنقش دارد و تغییر در این ناحیه می‌تواند ساختار سوم tRNAرا مختل کند. این امر ممکن است به کاهش tRNA عملکردی، بارگیری نادرست آمینواسید، و در نهایت اختلال در فرایند پروتئین‌سازی منجر شود. این اختلالات می‌توانند موجب کاهش یا تغییر در ساختار آنزیم‌های زنجیره تنفسی میتوکندریایی شوند. جهش G>A ۹۹۶۶ در ژن MT-CO3 که منجر به جایگزینی اسید آمینه والین با ایزولوسین در موقعیت ۲۵۴ این پروتئین نیز میشود، توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی به عنوان جهشی بیماری‌زا ارزیابی شد. این یافته با مطالعات قبلی که جهش در این ژن را با نقص در کمپلکس IV و اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو مرتبط دانسته‌اند، همخوانی دارد (۲۹). مدل‌سازی مولکولی نیز نشان داد که این جایگزینی باعث ایجاد تنش استری میشود که می‌تواند پایداری پروتئین را کاهش دهد. با توجه به اینکه فراوانی همه واریانت‌های شناسایی شده در این مطالعه در نمونه‌های کنترل پایین بوده و هم‌چنین فرکانس آللی جزئی (MAF) آن‌ها در پایگاه‌های داده عمومی نظیر پروژه ۱۰۰۰ ژنوم بسیار کم گزارش شده است، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که تغییرات

CCBY-NC.4.0 DEED

نوکلئوتیدی شناسایی شده در این تحقیق ممکن است در پاتوژنز CHنقش داشته باشند. وجود حالت هتروپلاسمی در برخی از این واریانت‌ها نیز با ماهیت بیماری‌های میتوکندریایی هماهنگ است، چرا که بیان فنوتیپی این جهش‌ها به نسبت آلل جهش‌یافته به وحشی بستگی دارد (۳۰). این پدیده می‌تواند توجیهی برای تنوع فنوتیپی مشاهده شده در بیماران باشد. با توجه به اینکه این جهش‌ها در نواحی حفاظت‌شده ژنی اتفاق افتاده و در نمونه‌های کنترل دیده نشده‌اند، بر اساس تحلیل‌های بیوانفورماتیکی انتظار می‌رود که این تغییرات بر ساختارtRNA، عملکرد پروتئین و در نهایت تولید ATP تأثیرگذار باشند. از آنجایی که حضور ید برای سنتز هورمون‌های تیروئیدی حیاتی است، کاهش تولید ATP می‌تواند ذخیره و تجمع ید در سلول‌های تیروئیدی را مختل کند. زیرا سیمپورتر سدیم-ید (NIS) برای انتقال ید به درون سلول‌های تیروئید و سنتز هورمون، به شیب غلظتی ناشی از عملکرد پمپ سدیم-پتاسیم (برای حفظ گرادیان ید) وابسته است (۳۱). همچنین، اختلال در زنجیره تنفسی میتوکندری منجر به تولید گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) می‌شود که می‌توانند به سلول‌های تیروئید آسیب برسانند و باعث آپوپتوز یا اختلال در عملکرد آن‌ها شوند. سلول‌های تیروئید برای انجام عملکرد تخصصی خود نیاز به تغییرات متابولیک دارند. اختلال در میتوکندری می‌تواند در این برنامه‌ریزی مجدد ضروری اختلال ایجاد کند (۳۲).

یافته‌های این مطالعه به شواهد فزآینده‌ای مبنی بر نقش اختلالات میتوکندریایی در پاتوژنز کم‌کاری مادرزادی تیروئید (CH) می‌افزاید. شناسایی پنج واریانت میتوکندریایی، از جمله دو واریانت جدید ۱۰۰۱۱ A>Gدر tRNAGly و ۸۳۳۵ A>Gدر tRNALys ، همراه با تحلیل‌های بیوانفورماتیکی دقیق، نشان می‌دهد که ژنوم میتوکندریایی می‌تواند یک منبع مهم تغییرات پاتوژنیک در این بیماری باشد. نتایج ما نشان می‌دهد که واریانت‌های شناسایی شده در نواحی عملکردی حساس ژن‌های) tRNA حلقه TΨC و ناحیه آنتی‌کدون) و ژن کدکننده پروتئین (MT-CO3) واقع شده‌اند. پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی قویاً حاکی از آن است که این واریانت‌ها می‌توانند منجر به اختلال در عملکرد tRN، کاهش تولید پروتئین‌های میتوکندریایی، ایجاد نقص در زنجیره تنفسی و نهایتاً کاهش تولید ATP شوند. این اختلالات انرژی‌زیستی می‌تواند بر عملکرد غده تیروئید که به شدت به انرژی وابسته است، تأثیر منفی بگذارد. به طور خاص، تأیید بیماری‌زا بودن جهش ۹۹۶۶ G>A (p.Val254Ile)در ژن MT-CO3 توسط تمامی ابزارهای پیش‌بینی و همچنین قرارگیری واریانت‌های tRNA در نواحی حیاتی، مکانیسم‌های مولکولی محتملی را برای توجیه نقش این واریانت‌ها در پاتوژنز CH ارائه می‌دهد.

علیرغم یافته‌های ارزشمند، این مطالعه دارای محدودیت‌هایی است که باید در تفسیر نتایج و طراحی پژوهش‌های آتی مورد توجه قرار گیرد: حجم نمونه نسبتاً محدود ممکن است توان لازم برای شناسایی واریانت‌های نادر یا برقراری ارتباط آماری قوی با استفاده از آزمون‌های مقایسه‌ای متداول (مانند آزمون دقیق فیشر یا مجذور کای) را کاهش داده باشد. مطالعات آینده با نمونه‌های بزرگ‌تر و چند مرکزی برای تعیین فراوانی واقعی این واریانت‌ها و ارزیابی میزان خطر آنها ضروری است. هم‌چنین این مطالعه تنها بر دو ژن tRNA (tRNALys و tRNAGly) و یک ژن پروتئینی (MT-CO3) متمرکز بوده است. ژنوم میتوکندریایی حاوی ژن‌های حیاتی دیگری است که اختلال در آن‌ها ممکن است با فنوتیپ بیماری مرتبط باشد. بررسی جامع کل ژنوم میتوکندریایی (مانند توالی‌یابی کامل mtDNA) می‌تواند واریانت‌های مرتبط بیشتری را آشکار سازد. اگرچه تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نتایج پیش‌بینی‌کننده قوی ارائه داده‌اند، اما این یافته‌ها نیاز به تأیید توسط مطالعات عملکردی in vitro یا in vivo دارند. برای مثال،

CCBY-NC.4.0 DEED

ارزیابی مستقیم سطح tRNA، نرخ ترجمه پروتئین‌های میتوکندریایی، یا اندازه‌گیری فعالیت کمپلکس‌های زنجیره تنفسی در مدل‌های سلولی حاوی این واریانت‌ها ضروری است. در مجموع، این مطالعه بر اهمیت بررسی ژنوم میتوکندریایی در کنار ژنوم هسته‌ای در تشخیص علل کم‌کاری مادرزادی تیروئید تأکید می‌کند. شناسایی این واریانت‌ها نه تنها به درک بهتر مکانیسم‌های بیماری کمک می‌کند، بلکه می‌تواند در نهایت به توسعه راهکارهای تشخیصی و مشاوره ژنتیکی دقیق‌تر برای خانواده‌های بیمار منجر شود. انجام مطالعات عملکردی بیشتر بر روی این واریانت‌های خاص و نیز بررسی‌های جمعیتی با حجم نمونه بزرگ‌تر برای تعیین دقیق‌تر میزان خطر و نفوذ این واریانت‌ها پیشنهاد می‌شود.

تشکر و قدردانی

از پرسنل محترم کلینیک متابولیسم و غدد بخش کودکان بیمارستان شهید صدوقی یزد که در جمع‌آوری نمونه‌ها همکاری کردند و هم‌چنین از تمامی بیماران که در این پروژه همکاری داشتند، تشکر می‌گردد. بی‌شک بدون همیاری این عزیزان انجام این پژوهش میسر نبود.

تعارض در منافع: هیچ تضـاد منـافعی وجود ندارد.

حامی مالی: ندارد.

ملاحظات اخلاقی (کد اخلاق): IR.YAZD.REC.1402.050

مشارکت نویسندگان:

- **طراحی ایده:** محمدمهدی حیدری
- **روش کار:** سیدعلی مدنی منشادی و الهه جعفری‌نژاد بیدگلی و مهتاب اردویی
- **جمع‌آوری داده‌ها:** سیدعلی مدنی منشادی و الهه جعفری‌نژاد بیدگلی و مهتاب اردویی
- **تجزیه و تحلیل داده‌ها:** محمدمهدی حیدری و مهری خاتمی
- **نظارت:** محمدمهدی حیدری و مهری خاتمی
- **مدیریت پروژه:** محمدمهدی حیدری
- **نگارش پیش‌نویس:** محمدمهدی حیدری، الهه جعفری‌نژاد بیدگلی و مهری خاتمی
- **نگارش، بررسی و ویرایش نسخه نهایی:** محمدمهدی حیدری و مهری خاتمی

References

1. Klosinska M, Kaczynska A, Ben-Skowronek I. Congenital Hypothyroidism in Preterm Newborns – The Challenges of Diagnostics and Treatment: A Review. Frontiers in Endocrinology 2022; 13: 860862. http://doi.org/10.3389/fendo.2022.860862.

2. Andrade CLO, Alves CAD, Ramos HE. Congenital Hypothyroidism and the Deleterious Effects on Auditory Function and Language Skills: A Narrative Review. Front Endocrinol (Lausanne) 2021; 12: 671784. http://doi.org/10.3389/fendo.2021.671784.

3. Stoupa A, Kariyawasam D, Polak M, Carré A. Genetics of congenital hypothyroidism: Modern concepts. Pediatric Investigation 2022; 06 (02): 123-34. http://doi.org/doi:10.1002/ped4.12324.

CCBY-NC.4.0 DEED

4. Heidari MM, Madani Manshadi SA, Eshghi AR, Talebi F, Khatami M, Bragança J, et al. Mutational and bioinformatics analysis of the NKX2. 1 gene in a cohort of Iranian pediatric patients with congenital hypothyroidism (CH). Physiology International 2022; 109(2): 261-277. http://doi.org/doi: 10.1556/2060.2022. 00224.

5. Talebi F, Heidari MM, Khatami M, Ordooei M. Identification of Novel Missense Mutations of the TSH-β Subunit Gene in Pediatric Patients with Congenital Central Hypothyroidism. 2020; 11(3):e108948. doi: https://doi.org/ 10.5812/jjcmb.108948.

6. Khatami M, Heidari MM, Tabesh F, Ordooei M, Salehifar Z. Mutation analysis of the NKX2. 5 gene in Iranian pediatric patients with congenital hypothyroidism. Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism 2017; 30 (8): 857-62. http://doi.org/doi: 10.1515.

7. Kostopoulou E, Miliordos K, Spiliotis B. Genetics of primary congenital hypothyroidism—a review. Hormones 2021; 20 (2): 225-36.

8. Varughese R, Rahman S. Endocrine dysfunction in primary mitochondrial diseases. Endocrine Reviews 2025; 46 (3): 376-96.

9. Moura JP, Oliveira PJ, Urbano AM. Mitochondria: An overview of their origin, genome, architecture, and dynamics. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2025; 1871 (5): 167803. http://doi.org/https://doi.org/10.1016/ j.bbadis.2025.167803.

10. Suomalainen A, Nunnari J. Mitochondria at the crossroads of health and disease. Cell 2024; 187 (11): 2601-27. http://doi.org/10.1016/j.cell. 2024.04.037.

11. Richter U, McFarland R, Taylor RW, Pickett SJ. The molecular pathology of pathogenic mitochondrial tRNA variants. FEBS Lett 2021; 595 (8): 1003-24. http://doi.org/10.1002/1873-3468.14049.

12. Wen H, Deng H, Li B, Chen J, Zhu J, Zhang X, et al. Mitochondrial diseases: from molecular mechanisms to therapeutic advances. Signal Transduction and Targeted Therapy 2025; 10

CCBY-NC.4.0 DEED

(1): 9. http://doi.org/10.1038/s41392-024-02044-3.

13. Shen X, Du A. The non-syndromic clinical spectrums of mtDNA 3243A>G mutation. Neurosciences (Riyadh) 2021; 26 (2): 128-33. http://doi.org/10.17712/nsj.2021.2.20200145.

14. Chen S, Bao X, Chen H, Jia M, Li W, Zhang L, et al. Thyroid Cancer-Associated Mitochondrial DNA Mutation G3842A Promotes Tumorigenicity via ROS-Mediated ERK1/2 Activation. 2022; 9982449. doi: 10.1155/2022/9982449.

15. Korkmaz HA. Clinical insight into congenital hypothyroidism among children. Children 2025; 12 (1): 55.

16. Cavarzere P, Mancioppi V, Battiston R, Lupieri V, Morandi A, Maffeis C. Primary congenital hypothyroidism: a clinical review. Front Endocrinol (Lausanne) 2025; 16: 1592655. http://doi.org/10.3389/fendo.2025.1592655.

17. Al-Gadi IS, Haas RH, Falk MJ, Goldstein A, McCormack SE. Endocrine Disorders in Primary Mitochondrial Disease. J Endocr Soc 2018; 2 (4): 361-73. http://doi.org/10.1210/js.2017-00434.

18. Xu X, Pang Y, Fan X. Mitochondria in oxidative stress, inflammation and aging: from mechanisms to therapeutic advances. Signal Transduction and Targeted Therapy 2025; 10 (1): 190. http://doi.org/10.1038/s41392-025-02253-4.

19. Loos MA, Gomez G, Mayorga L, Caraballo RH, Eiroa HD, Obregon MG, et al. Clinical and molecular characterization of mitochondrial DNA disorders in a group of Argentinian pediatric patients. Molecular Genetics and Metabolism Reports 2021; 27: 100733. http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100733.

20. Fornuskova D, Brantova O, Tesarova M, Stiburek L, Honzik T, Wenchich L, et al. The impact of mitochondrial tRNA mutations on the amount of ATP synthase differs in the brain compared to other tissues. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2008; 1782 (5): 317-25. http://doi.org/https://doi.org /10.1016/j.bbadis.2008.02.001.

CCBY-NC.4.0 DEED

21. Stark R, Roden M. Mitochondrial function and endocrine diseases. European Journal of Clinical Investigation 2007; 37 (4): 236-48. http://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.2007.01773.x.

22. Meseguer S, Panadero J, Navarro-González C, Villarroya M, Boutoual R, Comi GP, et al. The MELAS mutation m.3243A>G promotes reactivation of fetal cardiac genes and an epithelial-mesenchymal transition-like program via dysregulation of miRNAs. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease 2018; 1864 (9, Part B): 3022-3037. http://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.06.014.

23. Li D, Liang C, Zhang T, Marley JL, Zou W, Lian M, et al. Pathogenic mitochondrial DNA 3243A>G mutation: From genetics to phenotype. Front Genet 2022; 13: 951185. http://doi.org/10.3389/fgene.2022.951185.

24. Mezghani N, Mkaouar-Rebai E, Mnif M, Charfi N, Rekik N, Youssef S, et al. The heteroplasmic m.14709T>C mutation in the tRNA(Glu) gene in two Tunisian families with mitochondrial diabetes. J Diabetes Complications 2010; 24 (4): 270-7. http://doi.org/10.1016/j.jdiacomp.2009.11.002.

25. Wang M, Liu H, Zheng J, Chen B, Zhou M, Fan W, et al. A Deafness- and Diabetes-associated tRNA Mutation Causes Deficient Pseudouridinylation at Position 55 in tRNAGlu and Mitochondrial Dysfunction. J Biol Chem 2016; 291 (40): 21029-41. http://doi.org/10.1074/jbc.M116.739482.

26. Lin X, Zhou Y, Xue L. Mitochondrial complex I subunit MT-ND1 mutations affect disease progression. Heliyon 2024; 10 (7): e28808. http://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e28808.

27. de Oliveira RC, dos Reis SP, Cavalcante GC. Mutations in Structural Genes of the Mitochondrial Complex IV May Influence Breast Cancer. Genes 2023; 14 (7): 1465.

28. Smith TJ, Giles RN, Koutmou KS. Anticodon stem-loop tRNA modifications influence codon decoding and frame maintenance during translation. Semin Cell Dev Biol 2024; 154: 105-13. http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2023.06.003.

CCBY-NC.4.0 DEED

29. Temena MA, Gokalp EE, Susam E, Cinar D, Kiztanir H, Kosger P, et al. Investigating the dual role of mitochondrial and nuclear genome variants in pediatric cardiomyopathies. Scientific Reports 2025; 15 (1): 16678. http://doi.org/10.1038/s41598-025-01007-0.

30. Parakatselaki ME, Ladoukakis ED. mtDNA Heteroplasmy: Origin, Detection, Significance, and Evolutionary Consequences. Life (Basel) 2021; 11 (7). http://doi.org/10.3390/life_ 11070633.

31. Bizhanova A, Kopp P. Minireview: The sodium-iodide symporter NIS and pendrin in iodide homeostasis of the thyroid. Endocrinology 2009; 150 (3): 1084-90. http://doi.org/10.1210/en.2008-1437.

32. Zhang Y, Han H, Zhang T, Zhang T, Ma L, Yang Z, et al. The Emerging Role of Mitochondrial Dysfunction in Thyroid Cancer: Mediating Tumor Progression, Drug Resistance, and Reshaping of the Immune Microenvironment. Biomolecules 2025; 15 (9): 1292.

CCBY-NC.4.0 DEED

Identification of Novel Variants in Mitochondrial tRNALys and tRNAGly Genes Associated with Congenital Hypothyroidism based on Molecular Evidence and Bioinformatic Analysis: A Case-Control Study

Mohammad Mehdi Heidari[1], Seyed Ali Madani Manshadi[2], Elaheh Jafari Nejad Bidgoli[3], Mehri Khatami[4], Mahtab Ordooei[5]

Received: 01/10/25 Sent for Revision: 27/01/26 Received Revised Manuscript: 05/05/26 Accepted: 10/05/26

Background and Objectives: Although several pathogenic factors underlying congenital hypothyroidism have been identified, the contribution of mitochondrial genome (mtDNA) variants remains incompletely understood. This study aimed to identify and functionally characterize mitochondrial variants in the tRNAGly and tRNALys genes in patients with congenital hypothyroidism.

Materials and Methods: In this case–control study, 75 patients aged 3–11 years and an equal number of healthy individuals as the control group were enrolled. Following DNA extraction from peripheral blood samples, the tRNAGly and tRNALys gene regions were amplified using touchdown PCR, and the variants were screened by single-strand conformational polymorphism (SSCP) analysis. The variants identified were confirmed by Sanger sequencing and subsequently analyzed using a panel of advanced bioinformatics tools to evaluate their effects on tRNA secondary structure, molecular stability, and predicted pathogenicity.

Results: Two variants in the tRNAGly gene, a missense mutation (p.Val254Ile) in the MT-CO3 gene encoding cytochrome c oxidase subunit III, and two heteroplasmic variants in the tRNALys gene (8335A>G and 8348A>G) were identified. The 10011A>G variant reduces tRNAGly secondary structure stability by disrupting hydrogen bonding, while 10034T>C, located in a critical variable loop region, may lead to codon misrecognition. The p.Val254Ile variant in MT-CO3 was predicted to be pathogenic by all in silico tools. The tRNALys variants are located within a region essential for ribosomal binding.

Conclusion: This study confirms the presence of diverse mitochondrial variants in patients and supports a potential role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of congenital hypothyroidism.

Keywords: Congenital hypothyroidism, Mitochondrial genome, Bioinformatics, tRNALys, tRNAGly, MT-CO3

Funding: This study was funded by Yazd University, Yazd, Iran.

Conflict of interest: None declared.

Ethical considerations: The Ethics Committee of Yazd University approved the study (IR.YAZD.REC.1402.050).

Authors' contributions:

- **Conceptualization:** Mohammad Mehdi Heidari
- **Methodology:** Seyed Ali Madani Manshadi, Elaheh Jafari Nejad Bidgoli, Mahtab Ordooei
- **Data collection:** Seyed Ali Madani Manshadi, Elaheh Jafari Nejad Bidgoli, Mahtab Ordooei
- **Formal analysis:** Mohammad Mehdi Heidari, Mehri Khatami
- **Supervision:** Mohammad Mehdi Heidari, Mehri Khatami
- **Project administration:** Mohammad Mehdi Heidari
- **Writing - original draft:** Mohammad Mehdi Heidari, Elaheh Jafari Nejad Bidgoli, Mehri Khatami
- **Writing - review & editing:** Mohammad Mehdi Heidari, Mehri Khatami

Citation: Heidari MM, Madani Manshadi SA, Jafari Nejad Bidgoli E, Khatami M, Ordooei M. Identification of Novel Variants in Mitochondrial tRNALys and tRNAGly Genes Associated with Congenital Hypothyroidism Based on Molecular Evidence and Bioinformatic Analysis: A Case-Control Study. *J Rafsanjan Univ Med Sci* 2026; 25 (2): 147-74. doi: 10.66224/jrums.25.2.147. [Farsi].

1- Associate Prof. of Molecular Genetics, Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, Iran , ORCID: 0000-0002-3328-4746
(Corresponding Author) Tel: (035) 31233381, E-mail: heidarimm@yazd.ac.ir
2- MSc in Genetics, Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, Iran
3- MSc in Genetics, Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, Iran
4- Associate Prof. of Molecular Genetics, Dept. of Biology, Yazd University, Yazd, Iran
5- Associate Prof. of Pediatrics, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

CCBY-NC.4.0 DEED